

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů
z řádu trubkonosí u pelikána afrického
(*Pelecanus rufescens*)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Kristýna Kopečná**

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

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

Termín odevzdání práce: 2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kristýna Kopečná
Název práce	<i>Cross-species</i> amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána afrického (<i>Pelecanus rufescens</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	Hlavní náplní mé bakalářské práce bylo nalézt polymorfní mikrosatelitní lokusy u pelikána afrického. V teoretické části je řešena problematika zařazení pelikána afrického do systému a jeho vlastnosti. Dále obecná charakteristika mikrosatelitů, jejich mutace a využití. V experimentální části jsem použila metodu <i>cross-species</i> PCR amplifikace pro nalezení polymorfních mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Celkem jsem testovala 213 párů primerů, které byly původně navrženy pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitů u ptáků z řádu trubkonosí. Pro dosažení požadovaných výsledků byla dále provedena elektroforetická separace produktů v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek a jejich následná vizualizace. Po otestování všech lokusů bylo nalezeno celkem 24 polymorfních mikrosatelitů se 2 až 3 alelami na lokus.
Klíčová slova	PCR amplifikace, mikrosatelit, trubkonosí, pelikán africký, <i>Pelecanus rufescens</i> , Procellariiformes
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kristýna Kopečná
Title of thesis	Cross-species amplification of microsatellites from Procellariiformes in Pink-backed Pelican (<i>Pelecanus rufescens</i>)
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of growth regulators
Supervisor	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>The main goal of my bachelor thesis was to find polymorphic microsatellite loci of the Pink-backed pelican. The problematics of classification of the Pink-backed pelican into the system and its description are solved in the theoretical part. Then I wrote about the general characteristics of microsatellites, their mutations and utilisation. I have used the cross-species PCR amplification method for finding polymorphic microsatellite loci in 6 unrelated individuals of the Pink-backed pelican in the experimental part. Overall I have tested 213 pairs of primers which were originally designed for amplification of polymorphic microsatellites for the Procellariiformes species. Then I have done the electrophoretic separation of products in a polyacrylamide gel in denaturing conditions and following visualisation for the results scoring. After testing all loci I have found totally 24 polymorphic microsatellites with 2–3 alleles per locus.</p>
Keywords	PCR amplification, microsatellites, Procellariiformes, <i>Pelecanus rufescens</i> , Pink-backed Pelican
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně
za použití citované literatury.

V Olomouci dne 2. 8. 2018

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. nejen za poskytnutí materiálů, cenné rady a odborné vedení, ale také za ochotu a čas, které mi věnoval při zpracování teoretické i experimentální části mé práce.

Obsah

1. Seznam zkratek.....	7
2. Úvod.....	8
3. Cíle práce.....	9
4. Literární přehled	10
1.1 Řád veslonozí.....	10
1.2 Čeleď pelikánovití.....	11
4.2.1 Pelikán africký	13
1.3 Mikrosatelity	14
4.3.1 Dělení mikrosatelitů.....	14
4.3.2 Mutace mikrosatelitů	15
4.3.3 Využití mikrosatelitů	15
4.3.4 Mikrosatelity u ptáků	16
4.3.5 Mikrosatelity u ptáků z řádu trubkonosí	16
5. Materiál a metody.....	28
5.1 Biologický materiál.....	28
5.2 PCR amplifikace DNA pelikána afrického	28
5.3 Zpracování produktů PCR pomocí elektroforetické separace	32
5.4 Použité chemikálie	34
5.5 Použité roztoky.....	35
5.6 Seznam používaných laboratorních přístrojů.....	37
6. Výsledky	38
7. Diskuze.....	45
8. Závěr	54
9. Použitá literatura.....	55

1. Seznam zkratek

A	adenin
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOP-PCR	PCR amplifikace s degenerovanými oligonukleotidovými primery (<i>Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR</i>)
G	guanin
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
SINEs	krátké rozptýlené jaderné elementy (<i>Short Interspersed Nucleat Elements</i>)
SSRs	jednoduché opakující se sekvence (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
STRs	krátké tandemové repetice (<i>Short Tandem Repeats</i>)
T	thymin

2. Úvod

Mikrosatelity jsou druh tandemových repeticí s délkou repetitivní jednotky 1–9 párů bází. Nacházejí se v kódujících i nekódujících částech genomu. Díky jejich kodominanci, vysoké variabilitě a somatické stabilitě jsou využitelné jako molekulární markery. Působením mutací se v populaci vyskytuje u mnoha mikrosatelitů více alel (až několik desítek), zjištěním jejich frekvencí lze využít tyto polymorfní mikrosatelity při testování paternity, genetickém mapování nebo pro studium genetické struktury populací. Mikrosatelitové lokusy mohou být izolovány buď *de novo*, pomocí *cross-species* PCR amplifikace nebo metodou *in silico*. Izolace *de novo* se využívá především u druhů, které jsou zkoumány poprvé.

Ve své bakalářské práci budu, pomocí *cross-species* PCR amplifikace, testovat mikrosatelity u šesti nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Mikrosatelity, které budu používat k testování, pocházejí od zástupců řádu trubkonosí a několik mikrosatelitů, které byly polymorfní u trubkonosých, pocházejících z řádů dlouhokřídlých a pěvců. Moje práce bude spočívat v nalezení polymorfních lokusů a v následné optimalizaci podmínek PCR a elektroforetické separace.

3. Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického s využitím *cross-species* primerů pro mikrosatelity, které jsou známe u ptáků z řádu trubkonosí.

4. Literární přehled

1.1 Řád veslonozí

Řád veslonozí (Pelecaniformes) zahrnuje velké vodní ptáky s veslovací nohou, na které jsou všechny 4 prsty spojeny plovací blánou (Gaisler *et* Zima, 2007). V tradičním pojetí systému tento řád obsahuje šest čeledí, jsou to pelikánovití (Pelecanidae), fregatkovití (Fregatidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae), terejovití (Sulidae), anhingovití (Anhingidae) a faetonovití (Phaethontidae). Toto tradiční pojetí podle Gaisler *et* Zima (2007) však neodpovídá současnému zařazení. V řádu veslonohých došlo s rozvojem molekulárních metod k několika zásadním změnám a každý autor jejich zařazení do systému pojímá rozdílně.

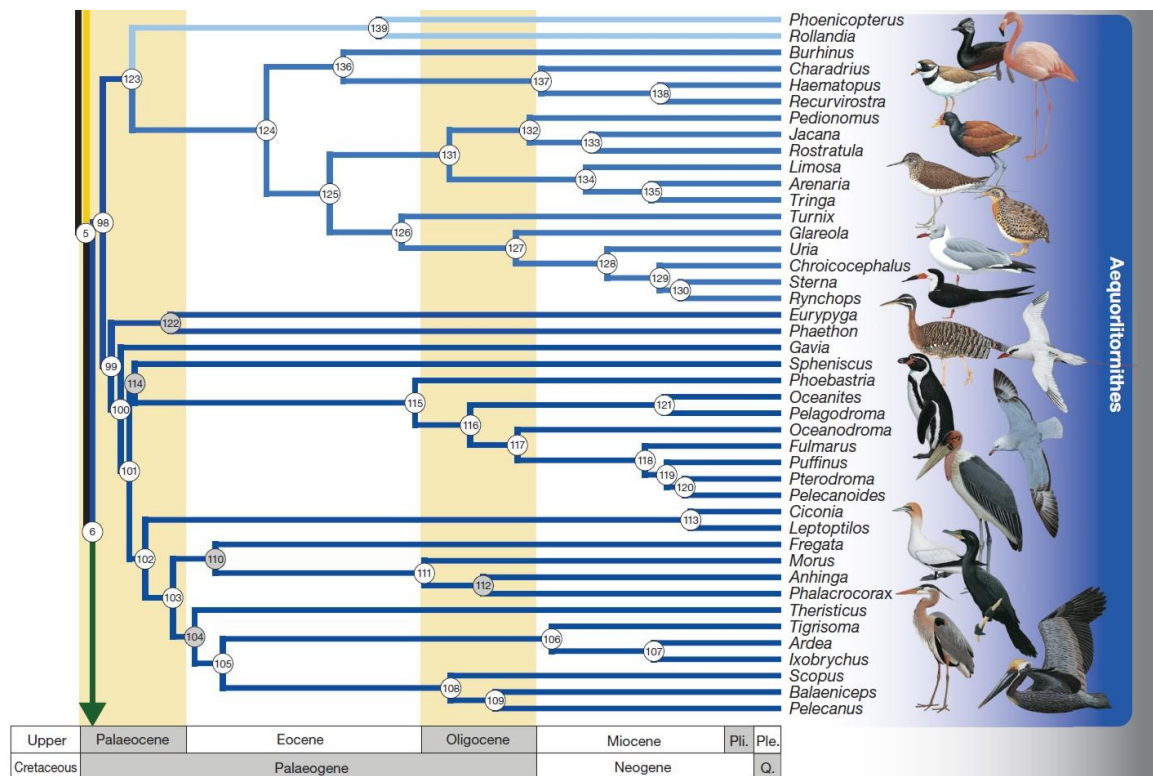
O tom, zda je řád veslonozí monofyletický, psali např. Hedges *et* Sibley (1994). Zamýšleli se nad původem veslonohých a také nad příbuzenskými vztahy mezi čeleděmi fregatkovití a buřňákovití (Procellariidae). Dále na základě testů DNA poukázali na příbuznost pelikánů a člunozobců. Čleď faetonovití se podle nich svými vlastnostmi odlišuje od terejovitých, kormoránovitých a anhingovitých.

Nad tím, zda je řád veslonozí monofyletický nebo ne, se zamýšlel také Smith (2010). Provedl různá srovnání s použitím molekulárních a morfologických analýz. Svým výzkumem došel k tomu, že všichni ptáci patřící do řádu veslonohých mají velice podobnou historii, ale mezi jednotlivými čeleděmi jsou velké rozdíly.

Jarvis *et al.* (2014) řešili vztahy mezi veslonohými zkoumáním celých genomů. Pro svoji analýzu vybrali 48 ptačích druhů z více než 10 řádů z celé skupiny Neoaves, z této velké skupiny byly vybrány 2 podřády, a to Columbea a Passera. Do Passera patří i skupina Aequornithia, do níž se řadí vodní ptáci a k ní sesterskou skupinu tvoří faetoni.

Prum *et al.* (2015) popsali další změny v systému vodních ptáků. Čleď faetonovití vydělili z řádu veslonohých a vytvořili samostatný řád faetoni. Dále od veslonohých oddělili také pelikány. Podle nového systému tedy tvoří rody pelikán, člunozobec a kladivouš sesterskou skupinu s čeledí volavkovití. Celý tento komplex dále tvoří sesterskou skupinu s čeledí ibisovití. Zbytek veslonohých, kteří jsou nově nazýváni jako řád Suliformes, tvoří sesterskou skupinou s komplexem, který je tvořen rody pelikán, člunozobec, kladivouš a čeleděmi volavkovití a ibisovití. Do Suliformes se pak řadí fregatky, anhingy, kormoráni a terejové.

Fregatkovití, terejovití, faetonovití a kormoránovití patří mezi mořské ptáky. U kormoránovitých existují i někteří sladkovodní zástupci. U pelikánovitých je tomu naopak, většina patří mezi sladkovodní a několik z nich mezi mořské ptáky. Anhingovití patří převážně mezi sladkovodní druhy (Brown *et al.*, 1982). Jednotliví zástupci žijí převážně v tropech a subtropích, ale objevují se i v mírném pásu. Společným charakteristickým znakem všech těchto ptáků je mohutný zobák s hrdelem vakem. Žijí většinou v koloniích, a hnízda stavějí buď na stromech nebo na zemi. Jejich mláďata se řadí mezi nidikolní (Gaisler *et Zima*, 2007).



Obrázek č.1: Schéma systému vodních ptáků podle Prum *et al.* (2015).

1.2 Čeleď pelikánovití

Čeleď pelikánovití (Pelecanidae) zahrnuje vodní ptáky, kteří patří k největším létavým ptákům (Brown *et al.*, 1982). Je známo celkem 8 druhů pelikánů, jsou to zástupci obývající oblasti vnitrozemských jezer a ústí velkých řek, někteří z nich ale žijí i na mořském pobřeží. Patří sem pelikán africký (*Pelecanus rufescens*), australský (*P. conspicillatus*), bílý (*P. onocrotalus*), hnědý (*P. occidentalis*), kadeřavý (*P. crispus*), severoamerický (*P. erythrorhynchos*), skvrnozobý (*P. philippensis*) a chilský (*P. thagus*). Vyskytují se v tropickém i mírném pásu po celém světě kromě východu Jižní Ameriky, Nového Zélandu a Oceánie (Hudec *et Hanzák*, 1974; Brown *et al.*, 1982).

Pelikáni jsou velcí a těžcí ptáci, proto jsou jejich kosti lehké a duté a váží cca 1 kg z celkové tělesné hmotnosti. Díky lehkým kostem mohou létat na dlouhé vzdálenosti bez odpočinku. Lehká kostra a přítomnost podkožních vzduchových váčků, umožňujících pelikánům plout, však zabraňují ponoření se hluboko do vody na rozdíl od kormoránů nebo anhing (del Hoyo *et al.*, 1992). U pelikánů bývají často samci větší než samice (Brown *et al.*, 1982). Samec i samice bývají zbarveni stejně (Gosler *et al.*, 1994). Sladkovodní druhy pelikánů jsou šedého nebo bílého zbarvení a mořští zástupci jsou zbarveni hnědě. Pelikáni mají velmi dlouhý a na konci mírně zahnutý zobák (Hudec *et Hanzák*, 1974). Jeho průměrná délka je okolo 25 cm, ale může dosáhnout až 47 cm u pelikána bílého. Mají velký roztažitelný vak, který slouží hlavně pro lov a následné krátkodobé uchování potravy. Pelikáni mají dlouhý krk, na který si při letu mohou položit svůj dlouhý zobák a šetřit tím síly (del Hoyo *et al.*, 1992). Nohy pelikánů jsou oproti tělu krátké (Hudec *et Hanzák*, 1974), jsou uzpůsobeny pro pádlování, proto jsou umístěny vzadu na těle a umožňují pelikánům pádlovat rychlostí až 6 km/h (del Hoyo *et al.*, 1992).

Potravou pelikánů jsou převážně ryby (Hudec *et Hanzák*, 1974). Pelikáni rybaří hlavně ve skupinách. Skupinový lov může být pozorován prakticky u všech druhů pelikánů. Každý druh pelikána má svůj vlastní způsob lovu potravy (del Hoyo *et al.*, 1992). Většina druhů loví ryby z hladiny, pelikán hnědý však loví pod vodou, do které se vrhá střemhlavým letem (Alderton *et al.*, 1995). Ryby téměř nikdy nenosí ve vaku, okamžitě po ulovení zobák uzavře a rybu spolkne (del Hoyo *et al.*, 1992). Vak, do kterého ryby loví, je třikrát větší než objem jeho žaludku (Alderton *et al.*, 1995).

Pelikáni hnízdí převážně v koloniích, hnízda vytvářejí hlavně v rákosí, křovinách nebo na volném prostranství (Hudec *et Hanzák*, 1974). Některé druhy mohou hnízdit i na stromech. Co se týče materiálu hnízda na zemi, jsou schopni postavit hnízdo i z vlastního trusu. Naproti tomu hnízda na stromech bývají propracovanější (del Hoyo *et al.*, 1992). Nejčastěji kladou 2–6 modrobílých vajec (Hudec *et Hanzák*, 1974). Rodiče se střídají v sezení na vejcích ve 24hodinových intervalech. Po vylíhnutí může někdy docházet k tzv. sourozeneckému vraždění, což se děje nejčastěji u pelikána kadeřavého nebo k vyhladovění mláďete u pelikána hnědého (del Hoyo *et al.*, 1992). Mláďata se líhnou holá s poměrně malým zobákem oproti tělu. Avšak hned po započnutí růstu prachového peří jim začne růst i zobák (Hudec *et Hanzák*, 1974). Mláďata pelikánů jsou nidikolní a zůstávají po vylíhnutí v hníždě. Potravu jim rodiče nosí do hnízda, většinou to bývají

polonatrávené ryby, které si mláďata vybírají z hrdelního vaku rodičů. Po vylíhnutí jsou krmena až 30x denně, ale postupně je četnost krmení omezována až na 1x denně (Hudec *et* Hanzák, 1974; del Hoyo *et al.*, 1992). Mladí pelikáni se učí lovit potravu od svých rodičů. Když opouštějí hnízdo, mají často velké zásoby tuku, aby byli schopni přežít počáteční neobratnost při lovu, avšak i tak jich mnoho zahyne (Alderton *et al.*, 1995). Pohlavní dospělosti dosahují až po několika letech života (Hudec *et* Hanzák, 1974).

4.2.1 Pelikán africký

Podle Gaisler *et* Zima (2007) je pelikán africký (*Pelecanus rufescens*) zařazován do systému následovně:

Říše:	živočichové (Animalia)
Kmen:	strunatci (Chordata)
Podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
Třída:	ptáci (Aves)
Řád:	veslonozí (Pelecaniformes)
Čeleď:	pelikánovití (Pelecanidae)
Rod:	pelikán (<i>Pelecanus</i>)
Druh:	pelikán africký (<i>Pelecanus rufescens</i>)

Pelikán africký je šedě zbarvený pták. Délka nataženého těla pelikána od špičky zobáku po konce nohou je cca 1,4 m, patří tak mezi menší druhy pelikánů (Gosler *et al.*, 1994). Vyskytuje se převážně v tropické a subtropické Africe, kde může být místy i přemnožený (Senegal, Etiopie a Botswana). Žije hlavně u řek, v bažinách a na velkých vodních plochách, jako jsou sladkovodní jezera nebo rybníky. V hustých lesích se pelikán africký spíše nevyskytuje. Hnízda staví na stromech buď u vody, nebo na písčinych ostrovech a ojediněle i blízko civilizace. Tento druh pelikána je tolerantnější k lidem než ostatní druhy (Brown *et al.*, 1982; del Hoyo *et al.*, 1992). Dospělí pelikáni bývají primárně šedí s šedým nebo růžovým zobákem. Oči bývají buď černé, nebo hnědé a nohy žluté. Obě pohlaví jsou si navzájem velice podobná s tím, že samice bývají o něco menší (Brown *et al.*, 1982). Oproti pelikánovi bílému mají ostatní druhy včetně pelikána afrického menší a kratší zobák. Mladí pelikáni bývají podobní dospělým (del Hoyo *et al.*, 1992). Mají však hnědavou hlavu a křídla na rozdíl od dospělých (Gosler *et al.*, 1994).

Pelikán africký žije v koloniích, které se uskupují na hnízdištích. Při lovu se však

pelikán od kolonie odděluje a loví samostatně. Loví většinou ráno nebo večer a je schopen přežít i v místech, kde je malé množství vody. Kořist loví pomalu s náhlým vnořením hlavy do vody, úspěšnost se pohybuje cca okolo 40–50 % (Brown *et al.*, 1982). Živí se rybami, a to převážně cichlidami. Pelikán africký loví ryby o hmotnosti okolo 80–300 g, ale dokáže chytat i ryby o hmotnosti 400 g. Většinou loví každý den, ale je schopen vydržet bez potravy i několik dní (Brown *et al.*, 1982; del Hoyo *et al.*, 1992). Páření probíhá po celý rok, většinou po konci období dešťů. Průměrně klade 2 vejce s inkubační dobou cca měsíc (del Hoyo *et al.*, 1992). Vejce jsou bleděmodrá a doba jejich kladení se liší podle ročního období a geografické oblasti, ve které hnízdí. Vylíhnutá mláďata jsou holá a růžově zbarvená. Krmena jsou oběma rodiči. Zhruba po třech týdnech jim začne růst peří. Po měsíci jsou mláďata již zcela opeřená a ponechána v hnízdě samotná. I u pelikána afrického je přítomná sourozenecká agrese a hladovění, což způsobuje poměrně vysokou mortalitu mláďat (Brown *et al.*, 1982). Sexuálně dospělými se stávají po 3–4 letech života. Dožívají se průměrně 6 let. Tento druh pelikána není nijak globálně ohrožen. Je hojně rozšířený a místy až přemnožený (del Hoyo *et al.*, 1992).

1.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou druhem krátkých tandemových repetitivních sekvencí (STRs) o délce 1–6 bp, bývají označovány jako jednoduché opakující se sekvence (SSRs) (Kantartzi, 2013; Vieira *et al.* 2016). Mikrosatelity jsou rozptýlené po celém genomu na různých chromozomech. Délka repetitivní jednotky se podle autorů liší, uvádějí např. 2–8 nebo 1–5 bp (Kantartzi, 2013). Tyto opakující se úseky vykazují velikou míru variability organismů, a proto se používají jako genetické markery např. při genetickém mapování nebo při studiích fylogenetických vztahů mezi druhy (Goldstein *et Schlötterer*, 1999). Mikrosatelity mohou být získány metodou *de novo* v případě druhů, které jsou zkoumány poprvé, pomocí *cross-species* PCR amplifikace u druhů, které jsou blíže příbuzné nebo z již existujících genetických databází tzv. *in silico* (Baker, 2000). Mikrosatelity můžeme najít jak v kódujících, tak nekódujících oblastech genomu, méně zastoupeny bývají v kódujících oblastech (Goldstein *et Schlötterer* 1999; Tóth *et al.*, 2000). Nejčastěji bývají mikrosatelity tvořeny repetitivní poly(A)/poly(T) (Goldstein *et Schlötterer* 1999).

4.3.1 Dělení mikrosatelitů

Tóth (2000) rozděluje mikrosatelity na mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa- a polynukleotidové. V genomu najdeme více zastoupené repetitivní sekvence tvořené

poly (A/T) než poly (C/G). Nejčastěji se vyskytujícími repeticemi jsou trinukleotidové a hexanukleotidové.

Podle Oliveira (2006) se mikrosatelity dělí podle typu opakující se sekvence na dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené. V ideálním mikrosatelitu nedochází k přerušování opakované sekvence žádnou jinou bází např. TATATATATATATATA. Naopak v nedokonalém mikrosatelitu se vyskytuje pár bází, který neodpovídá danému motivu např. TATATATACTATATA. U přerušovaných mikrosatelitů se nachází v repetitivní sekvenci více bází, které neodpovídají danému motivu např. TATATACGTGTATATATATA. A u složených mikrosatelitů je lokus tvořen dvěma různými spolu sousedícími jednotkami repetice např. TATATATATAGTGTGTGTGTGT.

4.3.2 Mutace mikrosatelitů

Mikrosatelity podléhají mutacím častěji než jiné oblasti genomu (Jarne *et* Lagoda, 1996). Četnost mutací u mikrosatelitů se liší mezi jednotlivými druhy a bývá obvykle 10^{-2} – 10^{-5} na nukleotid a generaci (Goldstein *et* Schlötterer, 1999). Četnost mutací mikrosatelitů závisí na opakovaném motivu, pohlaví, typu opakování, genotypu, velikosti alely a pozici na chromozomu (Kantartzi, 2013). Existují mechanismy, které popisují frekvence mutací u mikrosatelitů jako např. sklouznutí polymerázy během replikace, opravy DNA nebo chyby při rekombinaci. Při sklouznutí DNA polymerázy při replikaci dochází v místě repetice k dočasnému oddělení obou řetězců DNA a jejich opětovnému spojení na jiné pozici, tímto procesem vznikají chyby v párování bází a prodlužování nově vznikajícího vlákna (Oliveira *et al.*, 2006). Celý tento proces se také označuje jako DNA *replication slippage*, pravděpodobnost sklouznutí DNA polymerázy je závislá na délce mikrosatelitu (Schlötterer, 2000).

Mutace trinukleotidových mikrosatelitů hrají velkou roli při některých neurodegenerativních onemocněních u člověka jako je např. Huntingtonova choroba nebo myotonická dystrofie. Těmto mutacím se říká tzv. „dynamické“ (Tóth, *et al.*, 2000).

4.3.3 Využití mikrosatelitů

Mikrosatelity se využívají jako genetické markery ve studiu rozmanitosti druhů, vnitrodruhových vztahů nebo k odhadům míry příbuzenství mezi genotypy. Mikrosatelity jsou velice užitečné při zkoumání populační struktury, genetickém mapování nebo při studiu evolučních procesů (Vieira *et al.*, 2016). Nevýhodou mikrosatelitů je, že musejí

být nejprve izolovány *de novo* od druhů, které jsou zkoumány poprvé. Jelikož se mikrosatelity nacházejí hlavně v nekódujících oblastech genomu, je poměrně složité navrhnout tzv. univerzální primery (Zane *et al.*, 2002). Trinukleotidové a pentanukleotidové repetice jsou využívány ve forenzní a rodičovské analýze.

Tautz (1989) použil polymerázovou řetězovou reakci (PCR), aby u několika náhodně vybraných lokusů od různých druhů živočichů dokázal polymorfismus. Po amplifikaci mohou tyto polymorfismy být dále využity k testování totožnosti, při populačních studiích nebo při mapování genomu. Díky vysoké míře polymorfismu mohou být mikrosatelity využívány také jako markery pro studium vazby. U úzce příbuzných druhů lze použít PCR primery jednoho druhu k analýze polymorfismu u druhého druhu, tato metoda bývá nazývána jako *cross-species* PCR amplifikace (Moore *et al.*, 1991).

4.3.4 Mikrosatelity u ptáků

V ptačím genomu najdeme poměrně nízký počet mikrosatelitů, proto je zde výhodou přenositelnost mikrosatelitů (Oliveira *et al.*, 2006). Podle dostupných databází se v genomu ptáků vyskytuje cca 30 000–70 000 mikrosatelitů, které jsou delší než 20 bp. Hustota výskytu ptačích mikrosatelitů je daleko menší než v lidském genomu, což je způsobeno nižším počtem nekódujících úseků u ptáků. Také na rozdíl od lidského genomu u ptáků nejsou spojeny mikrosatelity se SINE elementy (Primmer *et al.*, 1997).

4.3.5 Mikrosatelity u ptáků z řádu trubkonosí

Zástupci trubkonosých se řadí mezi mořské ptáky, celý tento řád dělíme do 4 čeledí – albatrosovití (Diomedidae), buňňákovití (Procellariidae), buňňíkovití (Pelecanoididae) a buňňáčkovití (Hydrobatidae). V Laboratoři populační genetiky katedry buněčné biologie a genetiky (KBB) Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci je k dispozici 207 mikrosatelitů od 3 čeledí trubkonosých – albatrosovitých, buňňákovitých a buňňáčkovitých. Od čeledi buňňíkovití nebyly prozatím izolovány žádné mikrosatelity.

Dále je k dispozici ještě dalších 6 mikrosatelitů, které byly testovány metodou *cross-species* PCR amplifikace u trubkonosých a pocházejí od zástupců z řádů dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pěvci (Passeriformes). Pět z těchto mikrosatelitů bylo izolováno od dlouhokřídlých z čeledi alkovití (Alcidae), kulíkovití (Charadriidae)

a rackovítí (Laridae) – jeden mikrosatelit od alkouna obecného, jeden mikrosatelit od kulíka mořského a tři mikrosatelitní lokusy od racka novozélandského. Poslední z šesti mikrosatelitů pochází od lesňáčka žlutohého, který patří do čeledi lesňáčkovití (Parulidae) a řádu pěvci.

4.3.5.2 Mikrosatelity od druhů z čeledi albatrosovití

Od albatrosovitých jsem měla k dispozici celkem 53 polymorfních mikrosatelitů, které byly získány metodou *de novo* od 5 druhů – albatros bělohřbetý (*Phoebastria albatrus*), laysanský (*P. immutabilis*), černonohý (*P. nigripes*), stěhovavý (*Diomedea exulans*) a šedohlavý (*D. chrysostoma*).

Burg (1999) izolovala a popsala celkem 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů od dvou druhů – albatrosa šedohlavého a albatrosa stěhovavého. Při izolaci byla genomická DNA obou druhů štěpena restriční endonukleázou *AluI*. Fragmenty o velikosti 300–800 bp byly ligovány do plazmidu *SmaI*-cut pUC19 a následně byla provedena transformace do bakterie *Escherichia coli*. Poté byly vybrány klony s repeticí (AC)₁₅. Primery byly původně navrženy pro 31 mikrosatelitních lokusů, ale pouze 26 z nich bylo amplifikováno a poskytlo produkt. Ke *cross-species* PCR amplifikaci byla použita DNA od padesáti jedinců albatrosa černobrvého (*Diomedea melanophris*), padesáti jedinců albatrosa šedohlavého a devadesáti jedinců albatrosa stěhovavého. Úroveň polymorfismu se pohybovala od 2 do 10 alel. Pouze dva lokusy u albatrosa stěhovavého selhaly při amplifikaci, konkrétně se jednalo o mikrosatelity Dc10 a Dc19. U albatrosa černobrvého a šedohlavého však proběhla amplifikace těchto dvou lokusů úspěšně. Seznam izolovaných mikrosatelitních lokusů je uveden v Tabulce č.2. Tyto lokusy by měly být užitečné pro studium populační struktury, příbuzenských vztahů a páření u albatrosů.

Globální vztahy mezi černobrvými a šedohlavými albatrosy studovali Burg *et* Croxall (2001). K analýze populační struktury byla použita mitochondriální DNA a provedena mikrosatelitní analýza. Byla použita mitochondriální DNA 73 jedinců albatrosa černobrvého a 50 jedinců albatrosa šedohlavého. V rámci tohoto experimentu byly použity polymorfní mikrosatelitní lokusy od Burg (1999) a doplněny o lokus De35, který byl izolován *de novo*. Izolace DNA byla provedena z krve testovaných jedinců extrakcí za použití Chelexu. K následné populační analýze bylo z 37 mikrosatelitů vybráno 7 lokusů, které vykazovaly největší variabilitu. Mezi nimi byl i lokus De35, pro

který bylo u albatrosa černobrvého nalezeno 12 alel v populaci 660 jedinců na lokus a u albatrosa šedohlavého 22 alel na lokus v populaci 699 jedinců.

Fylogenetické souvislosti mezi albatrosem stěhovavým, albatrosem jižním (*D. antipodensis*) a albatrosem Gibsonovým (*D. gibsoni*) popisují Burg *et* Croxall (2004). Krevní vzorky použité k analýze byly odebrány od dospělých jedinců ze sedmi ostrovů v Atlantském oceánu. Celkem bylo odebráno 772 vzorků a genomická DNA byla izolována extrakcí za použití Chelexu. Opět byly použity mikrosatelitní lokusy z práce Burg (1999) a jeden nově izolovaný lokus De37. Tento byl polymorfní u všech testovaných druhů a vykazoval 6–7 alel. Pro lokus De33 byla zjištěna vazba na pohlaví, proto nebyl v testování vůbec použit. Ostatní polymorfní mikrosatelity vykazovaly 2–21 alel na lokus.

Dubois *et al.* (2005) popsali deset nových dinukleotidových mikrosatelitů pro albatrosa stěhovavého. K izolaci DNA byla použita krev testovaných jedinců s využitím QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Následně byly mikrosatelity izolovány z genomových knihoven a pomocí mikrosatelitních sond, které byly značeny biotinem a magnetických částic, na jejichž povrchu byl streptavidin. Poté byly použity ultrakompetentní bakterie XL10 Gold *E. coli*. Celkem bylo screenováno 1248 klonů a pozitivní signál dalo 254 z nich. Bylo vybráno 132 pozitivních klonů, 94 sekvencí zahrnovalo repetitivní oblast a obě hraniční oblasti, které nám umožňují navrhnout primery. Nakonec použili 15 lokusů, které měly nejvyšší počet nepřetržitě se opakujících sekvencí. Variabilita byla screenována u tří populací albatrosa stěhovavého, v každé z populací bylo testováno 20 jedinců. Dvě populace byly lokalizovány na soustroví Crozet, které se nachází v jižní části Indického oceánu a třetí populace se nacházela na hlavním ostrově soustroví Kerguelen, ty jsou od Crozetu vzdáleny cca 1500 km. Z 15 lokusů se jich ukázalo 10 jako polymorfních a na lokus bylo detekováno 2–13 alel. *Cross-species* PCR amplifikace těchto deseti mikrosatelitů byla provedena u dalších mořských ptáků – buňáka Bulwerova, buňáka šedého a buňáka sněžného (*Pagodroma nivea*). Ze všech deseti mikrosatelitů došlo k amplifikaci osmi mikrosatelitů, 6F12 a 7D18 se neamplifikovaly vůbec. Polymorfní lokusy byly nalezeny u buňáka Bulwerova (5) a u buňáka sněžného (3). Počty alel autoři neuvádějí. U buňáka šedého byly všechny amplifikované lokusy monomorfní.

Patnáct polymorfních mikrosatelitů od tří druhů albatrosů charakterizovali

Hernandéz *et al.* (2014), konkrétně se jednalo o albatrosa černonohého, albatrosa laysanského a albatrosa bělohřbetého. Izolace genomické DNA byla provedena extrakcí ze svalové tkáně testovaných jedinců za použití DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN). Genová knihovna byla sestavena pomocí NEBNext® Ultra™ DNA 19 Library prep Kit for Illumina® a NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina. Celkem bylo vyselektováno 16 lokusů, z původních 44, které obsahovaly di-, tri- a tetranukleotidové repetice, pro screening 36 jedinců albatrosa černonohého, 12 jedinců albatrosa laysanského a 3 jedince albatrosa bělohřbetého. Finálně bylo charakterizováno 15 mikrosatelitních lokusů. Amplifikací genomické DNA albatrosa černonohého a albatrosa laysanského bylo zjištěno 13 polymorfních lokusů s 2–18 alelami na lokus, 14 mikrosatelitů bylo polymorfních u albatrosa bělohřbetého s 2–7 alelami na lokus.

4.3.5.2 Mikrosatelity u zástupců z čeledi buřňáčkovití

Od buřňáčkovitých jsem testovala celkem 53 polymorfních mikrosatelitů od 3 druhů – buřňáček dlouhokřídlý (*Oceanodroma leucorhoa*), madeirský (*O. castro*) a Monteirův (*O. monteiroi*).

Primery pro deset mikrosatelitních lokusů od buřňáčka dlouhokřídlého a buřňáčka madeirského navrhli Sun *et al.* (2009). Konkrétně byla testována variabilita 27 jedinců buřňáčka madeirského, 24 jedinců buřňáčka dlouhokřídlého a 22 jedinců buřňáčka Monteirova. Genomová knihovna byla sestavena z krevních vzorků od sedmi jedinců buřňáčka madeirského za použití klonování. DNA byla štěpena pomocí restriktazy *AluI* a následně byly vybrány fragmenty o délce 200 až 1200 bp. Tyto fragmenty byly následně pročištěny pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) a ligovány do SNX linkerů. Produkt ligace byl pomocí hybridizace doplněn o oligonukleotidové sondy. DNA obohacená o mikrosatelity byla amplifikována použitím SNX-F primerů a vpravena do vektoru PCR 2.1-TOPO a transformována do TOP 10 One Shot *E. coli*. Z genomové knihovny, která obsahovala 96 klonů jich bylo 53 osekvenováno. Čtyřicet šest klonů obsahovalo mikrosatelity a pouze devět z nich obsahovalo devět nebo více jednoduchých opakování a hraniční sekvence potřebné pro navržení primerů. Kromě DNA buřňáčka madeirského byly do genomové knihovny přidány i vzorky DNA buřňáčka dlouhokřídlého. Z těchto vzorků bylo celkem osekvenováno dvacet jedna klonů, ale pouze pro dva byly navrženy páry primerů. Z těchto 2 párů primerů byl použit jeden, který po amplifikaci poskytl produkt. Od buřňáčka Monteirova a buřňáčka madeirského

bylo polymorfních 9 mikrosatelitů, pro buňňáčka dlouhokřídleho jich bylo jako polymorfních detekováno 6. Od všech druhů bylo zjištěno 2–11 alel na lokus. Většina z navržených primerů také poskytla produkty PCR u buňňáčka galapážského (*O. tethys*), buňňáčka límcevého (*O. hornbyi*) a buňňáka tmavohřbetého (*Pterodroma phaeopygia*), který patří do čeledi buňňákovití. Výjimkou byly primery pro amplifikaci lokusů Oc64B a Oc79-2, které po amplifikaci produkt neposkytly.

Dvacet šest nově izolovaných mikrosatelitních lokusů u buňňáčka dlouhokřídleho charakterizovali Bicknell *et al.* (2011). Jedná se o mikrosatelitní lokusy Ole01 až Ole26. Genomická DNA bylo izolována z krve testovaných jedinců a přesrážena octanem amonným. Výsledná genomová knihovna byla obohacena o repetice, na které byly navázány magnetické částice. Po osekvenování transformovaných kolonií získali 211 mikrosatelitních sekvencí, ale pouze pro 50 z nich byly navrzeny primery. Pro nalezení polymorfních mikrosatelitů byly použity nové i již existující mikrosatelitní lokusy. Z nově navržených primerů jich bylo testováno 50 na 4–6 jedincích, 6 z nich se neamplifikovalo a 26 bylo polymorfních (Ole01–Ole26). Z existujících mikrosatelitů bylo použito 7 mikrosatelitů, které byly izolovány od jiných druhů buňňákovitých (Sun *et al.*, 2009), dále 47 mikrosatelitů s vysokou *cross-species* přenositelností (Dawson *et al.*, 2010). Testování nových i již existujících mikrosatelitů bylo nejprve provedeno na 4–6 jedincích buňňáčka dlouhokřídleho. Celkem bylo testováno 47 původních lokusů na 6 jedincích, z nich se dva lokusy nepodařilo amplifikovat a 15 jich bylo označeno jako polymorfních. Celkem tedy bylo získáno 41 polymorfních lokusů, které byly testovány na 24 jedincích a bylo u nich detekováno 2–22 alel na lokus. U čtyř mikrosatelitních lokusů (Ole10-39, Ole12, Ole20 a Ole26) byla zjištěna vazba na pohlaví, konkrétně na Z chromozom.

Osmnáct polymorfních mikrosatelitů od buňňáčka Monteirova a *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů od dalších trubkonosých charakterizovali Bried *et al.* (2012). Genomická DNA byla izolována z krevních vzorků použitím QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelity byly poté izolovány z obohacených genomových knihoven a následně byly pyrosekvenovány. Byly vybrány sekvence o délce 80–469 bp, které obsahovaly repetitivní sekvenci delší než 5 opakování. Celkem bylo testováno 754 vzorků, 27 lokusů s nejvyšším počtem nepřetržitých opakování bylo poté použito pro analýzu. Kvůli problémům při amplifikaci bylo k finálnímu testování na 125 jedincích

buňňáčka Monteirova použito 18 lokusů. Na jeden lokus bylo detekováno cca 4–17 alel. U mikrosatelitu Omn23 by mohla být vazba na pohlaví, jelikož u žádné z testovaných samic nebyla pozorovaná heterozygotnost v případě tohoto lokusu. *Cross-species* PCR amplifikace od dalších trubkonosých probíhala konkrétně u buňňáčka madeirského, buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) a buňňáka modravého (*Halobaena caerulea*), poslední dva zmíněné druhy patří do čeledi buňňákovití. Ke *cross-species* PCR amplifikaci bylo použito původně navržených 18 mikrosatelitů. Nejúspěšněji proběhla amplifikace u buňňáčka madeirského, kde došlo k amplifikaci všech lokusů a z nich bylo polymorfních 17 mikrosatelitů se 2–6 alelami. Pro buňňáka Bulwerova, který patří do čeledi buňňákovití, bylo amplifikováno 7 lokusů a z nich detekovány 2 polymorfni mikrosatelity se dvěma alelami a pro buňňáka modravého, který také patří do buňňákovitých, došlo k amplifikaci u 6 mikrosatelitů a byly zjištěny 2 polymorfni mikrosatelity se 3 a 6 alelami.

4.2.2 Mikrosatelity od druhů z čeledi buňňákovití

Od zástupců z čeledi buňňákovití jsem testovala nejvíce polymorfních mikrosatelitů, celkem 100 od 9 druhů – buňňák baleárský (*Puffinus mauretanicus*), Bulwerův (*Bulweria bulwerii*), bělobradý (*Procellaria aequinoctialis*), havajský (*Pterodroma sandwichensis*), světlonohý (*Puffinus carneipes*), šedý (*Calonectris diomedea*), taiko (*Pterodroma magentae*), trinidadský (*Pterodroma arminjoniana*) a útlozobý (*Pachyptila belcheri*).

Šest polymorfních mikrosatelitních lokusů bylo izolováno a charakterizováno Techow *et* O’Ryan (2004). Dané dinukleotidové mikrosatelitní lokusy byly navrženy pro buňňáka bělobradého. Genomická DNA byla izolována metodou fenol-chloroformové extrakce z tkání jedinců. Tkáně byly odebírány od uhynulých jedinců a štěpeny proteinázou K. Genomová knihovna byla sestavena z DNA pěti jedinců buňňáka bělobradého metodou PCR amplifikace s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP-PCR) a následně byla obohacena o repetice CA. Dále došlo k hybridizaci produktů pomocí biotinylované CA repetitivní sondy, která byla navázána na streptavidin MagneSphere® magnetické částice. Vzniklé fragmenty byly naklonovány použitím pGEM-T-Easy Vector System. Celkem bylo osekvenováno 21 inzertů, z nichž 17 obsahovalo mikrosatelity. Pro 10 mikrosatelitních lokusů s vhodnými hraničními sekvencemi byly navrženy primery. K testování variability bylo použito 68 jedinců

buřňáka bělobradého. Polymorfismus byl detekován pro 6 mikrosatelitů, které obsahovaly 3 až 9 alel na jeden lokus. Tyto mikrosatelity byly dále testovány metodou *cross-species* PCR amplifikace u odlišných druhů trubkonosých, konkrétně u albatrosa černobrvého, albatrosa stěhovavého, albatrosa šedohlavého patřících do čeledi albatrosovití, dále u buřňáka tristanského (*Procellaria conspicillata*), buřňáka obrovského (*Macronectes giganteus*) a buřňáka Hallova (*M. hallis*) patřících do čeledi buřňákovití. U buřňáka tristanského bylo nalazeno 6 polymorfních mikrosatelitů z 10 testovaných. Naopak nejméně polymorfních lokusů bylo nalezeno u albatrosa stěhovavého a to pouze 1, konkrétně Paequ2. Pro zbylé druhy bylo detekováno 3–5 polymorfních mikrosatelitů. Údaje o počtu alel nejsou autory uvedeny.

Jedenáct polymorfních dinukleotidových mikrosatelitů popsali Bried *et al.* (2008) u buřňáka šedého. K navržení markerů byla použita DNA ze vzorků získaných od jedinců žijících na ostrově Vila Islet v Azorském souostroví. Genomická DNA byla extrahována z krve jedinců použitím QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitní lokusy byly poté izolovány z obohacené genomové knihovny za použití biotinem značených oligonukleotidových sond, magnetických částic pokrytých streptavidinem a XL10 ultrakompetentních bakterií *E. coli* (Dubois *et al.*, 2005). Celkem bylo screenováno 3036 klonů. 262 z nich bylo následně osekvenováno použitím ABI3100 sekvenátoru. Repetitivní i obě hraniční oblasti obsahovalo 132 sekvencí. Pro jejich amplifikaci byly navrženy PCR primery, z nich bylo poté vybráno 15 mikrosatelitních lokusů, které byly vybrány k analýze, protože jejich repetitivní sekvence byla dostatečně dlouhá a nepřetržitá. PCR amplifikace byla provedena u 43 jedinců buřňáka šedého, a to nejprve zvlášť pro každý lokus a poté multiplexně pro 3 sady lokusů (Cd1, Cd3 a Cd11; Cd4, Cd5, Cd6 a Cd7; Cd2, Cd8 a Cd9). Z 15 lokusů jich bylo 11 polymorfních, kdy bylo detekováno 2–8 alel na lokus. Žádný z 23 samičích vzorků nebyl heterozygotní pro lokus Cd4, takže se předpokládá jeho vazba na pohlaví (na Z chromozom). Polymorfní mikrosatelity byly dále testovány metodou *cross-species* PCR amplifikace u dalších 3 druhů – albatrosa stěhovavého z čeledi albatrosovití, buřňáka bělobradého a buřňáka Bulwerova. Nejvíce polymorfních lokusů bylo nalezeno u buřňáka Bulwerova, k amplifikaci u něj došlo u všech lokusů a 10 z nich bylo označeno za polymorfní. U buřňáka bělobradého došlo k amplifikaci 7 lokusů, ale pouze 2 z nich byly polymorfní. Nejméně lokusů se amplifikovalo u albatrosa stěhovavého, konkrétně 5 a z nich byl pouze jeden označen za polymorfní. Počty alel autoři neuvádějí.

Lawrence (2008) popsala dva polymorfní mikrosatelitní lokusy u buňňáka taiko. Genomická DNA byla izolována z krve a peří 145 jedinců pomocí fenol-chloroformové extrakce. Následně byla sestavena genomová knihovna, která byla obohacena o repetice GA, GT, AAT, GATA a AAAG. Celkem bylo testováno 2016 klonů a z nich bylo 178 osekvenováno. U 99 z nich byla detekována přítomnost mikrosatelitů. Pouze pro 9 sekvencí byly navrženy primery programem Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Následovala PCR amplifikace, pomocí které byly nalezeny 2 polymorfní mikrosatelity, konkrétně Tch6 a Tch25. První mikrosatelitní lokus obsahoval 2 alely, u druhého byly detekovány 4 alely na jeden lokus. U buňňáka taiko bylo dále testovaných 22 mikrosatelitních lokusů, které byly původně navrženy pro jiné druhy ptáků. Testování probíhalo metodou *cross-species* PCR amplifikace. Jako polymorfních bylo označeno 6 mikrosatelitů s 2–9 alelami. Konkrétně se jednalo o mikrosatelity: De33 (Burg, 1999), Paequ3, Paequ8, Paequ13 (Techow *et* O’Ryan, 2004), RBG18 a RBG29 (Given *et al.*, 2002). Poslední dva mikrosatelity byly původně navrženy pro racka novozélandského z řádu dlouhokřídlí.

Gonzales *et al.* (2009) popsali 10 polymorfních mikrosatelitů u buňňáka baleárského, který se řadí mezi kriticky ohrožené druhy. Genomická DNA byla izolována z tkáně jedinců fenol-chloroformovou extrakcí a použitím ethanolu a proteinázy K. Genomové knihovny byly sestaveny a obohaceny o repetice CA a AAAG. Následně byla biotinylovaná DNA vpravena do vektoru pGEM-T-Easy. Transformováno bylo celkem 850 kolonií, které byly hybridizovány. Pozitivní klony byly osekvenovány pomocí M13 primerů na automatizovaném sekvenátoru PRISM3730 (Applied Biosystems) s ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing ready. K osekvenování bylo navrženo 162 klonů a 108 z nich obsahovalo mikrosatelity. Primery byly navrženy pro 23 sekvencí pomocí programu Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). 19 párů primerů bylo úspěšně amplifikováno a polymorfismus byl testován na 55 jedincích buňňáka baleárského. Jako polymorfních bylo označeno 10 mikrosatelitních lokusů s počtem alel 2–10. Byl nalezen jeden mikrosatelit, který byl vázaný na pohlaví, konkrétně na chromozomu W, takže k jeho amplifikaci docházelo pouze u samic. Jednalo se o lokus Puff Sma6. Dále bylo metodou *cross-species* PCR amplifikace testováno těchto 10 mikrosatelitů u dalšího druhu, konkrétně u buňňáka středomořského (*P. yelkouan*). Došlo k amplifikaci všech deseti lokusů a jako polymorfních jich bylo označeno 9 s počtem alel 2–10. Výjimkou byl Puff Sma6, který byl vázaný na chromozom W (amplifikace pouze u samic).

Šest mikrosatelitních lokusů izolovali Brown *et* Jordan (2009) u buňňáka trinidadského. Genomická DNA byla izolována z tkáně tří uhynulých mláďat metodou fenol-chloroformové extrakce. Mikrosatelitní lokusy byly izolovány z genové knihovny, která byla obohacena o repetice CA a CAGA. Vybrané fragmenty o délce 500–1000 bp byly naklonovány Original TA Cloning Kit (Invitrogen) a klony, které byly pozitivní, byly dále testovány. Plazmidy, které obsahovaly mikrosatelity byly poté osekvenovány pomocí M13 primerů a BigDye Terminator Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems). Primery byly navrženy opět programem Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Celkem bylo testováno 340 jedinců buňňáka trinidadského a bylo použito 43 párů primerů. Pouze u 6 z nich došlo k amplifikaci a tvorbě produktu, konkrétně se jednalo o mikrosatelity Parm01–Parm06. Z těchto 6 amplifikovaných mikrosatelitních lokusů byly 3 (Parm01, Parm02 a Parm03) polymorfní s počtem alel 4–10. Zbylé 3 mikrosatelity (Parm04, Parm05 a Parm06) byly u buňňáka trinidadského monomorfní, ale u některých dalších testovaných druhů vykazovaly polymorfismus. Testy probíhaly u 17 dalších druhů ptáků z řádu trubkonosí a poté u jednoho zástupce tučňáků, tučňáka žlutorohého (*Eudyptes chrysolophus*). Testováno bylo všech 6 navržených mikrosatelitních lokusů metodou *cross-species* PCR amplifikace. K amplifikaci mikrosatelitů Parm01 a Parm02 došlo u všech 17 testovaných jedinců. V případě lokusu Parm01 byl detekován polymorfismus u 12 testovaných druhů a lokus Parm02 byl polymorfní u 5 druhů. Mikrosatelit Parm03 byl polymorfní u 5 druhů se 2–6 alelami a Parm04 byl označen za polymorfní u 4 druhů s počtem alel 2–4 alelami. Mikrosatelit Parm05 poskytl produkt pouze u 4 druhů a u 3 byl detekován polymorfismus s počtem alel 2–3. Poslední lokus Parm06 byl amplifikován u 16 druhů a polymorfní byl u 6 druhů se dvěma alelami. Co se týče tučňáka žlutorohého, u něj došlo k amplifikaci 4 lokusů z nichž 3 byly polymorfní, konkrétně Parm01, Parm02 a Parm03 a obsahovaly 2–7 alel. U zdrojového druhu – buňňáka trinidadského probíhalo další testování pomocí *cross-species* PCR amplifikace s primery, které byly původně navrženy pro 53 mikrosatelitů izolovaných od albatrosa stěhovavého (Burg, 1999; Dubois *et al.*, 2005), buňňáka bělobradého (Techow *et* O’Ryan, 2004) a kulíka mořského (*Charadrius alexandrinus*) (Küpper *et al.*, 2007), který patří do řádu dlouhokřídlí. Celkem bylo nalezeno 6 polymorfních lokusů s počtem alel 2–6, konkrétně: 10C5, 12H8 a De11 izolovaných od albatrosa stěhovavého, Paequ3 a Paequ13 od buňňáka bělobradého a Calex01 od kulíka mořského.

Jedenáct nových variabilních mikrosatelitních lokusů popsali u buňňáka

Bulwerova Andris *et al.* (2010). K charakterizaci markerů byla použita DNA od jedinců žijících na ostrově Vila Islet, který leží v jižní části Indického Oceánu. Genomická DNA byla izolována z krve extrakcí použitím QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitní lokusy byly následně izolovány z obohacené genomové knihovny použitím biotinem značených mikrosatelitních oligonukleotidových sond, streptavidinem pokrytých magnetických částic a vysoce kompetentních buněk JM 09 *E. coli*. Celkem bylo screenováno 768 klonů z nichž 392 dalo pozitivní signál. Všechny pozitivní klony byly osekvenovány pomocí ABI 3130 genetického analyzátoru. Bylo vybráno 282 sekvencí, které obsahovaly repetitivní oblast i obě hraniční oblasti. Pro další analýzu bylo poté použito 25 lokusů s nejvyšším počtem nepřerušovaných opakování. PCR amplifikace byla provedena nejprve pro každý lokus zvlášť a poté pro 3 lokusové sady (Bb2, Bb7, Bb20, Bb22 a Bb10; Bb10, Bb11, Bb12, Bb21 a Bb23; Bb3 a Bb25). Celkový počet testovaných jedinců žijících na Vila Islet byl 91. Z 25 lokusů bylo 24 z nich označeno jako polymorfních s počtem alel 2–8. Ale z kvůli problémům při amplifikaci a nedostatku heterozygotů bylo zachováno pouze 11 mikrosatelitních lokusů. Pro mikrosatelit Bb11 nevykazovala žádná ze 44 testovaných samic heterozygotnost, proto byla u tohoto lokusu prokázána vazba na pohlaví, konkrétně na Z chromozom. Následně byly s vybranými 11 mikrosatelity provedeny testy metodou *cross-species* PCR amplifikace u dalších 3 druhů – buňáka bělobradého, buňáka modravého (*Halobaena caerulea*) a buňáčka Monteirova, který patří do čeledi buňáčkovití. Nejvíce polymorfních lokusů bylo nalezeno u buňáka modravého, konkrétně 10. U buňáka bělobradého bylo nalezeno celkem 6 polymorfních lokusů a nejméně jich bylo nalezeno u buňáčka Monteirova, kde došlo k detekci pouze pěti mikrosatelitních lokusů.

Welch *et* Fleischer (2011) popsali 10 polymorfních mikrosatelitních markerů pro buňáka havajského. Genomická DNA byla izolována ze vzorku tkáně jedné samice a jednoho samce. Izolovaná DNA byla dále štěpena na fragmenty o délce 200–1000 bp. Následovala ligace fragmentů do SNX linkerů a jejich amplifikace. Tyto fragmenty byly poté obohaceny o mikrosatelitní repeticity hybridizací s oligonukleotidovými sondami. Po hybridizaci byly fragmenty vpraveny do pBluescript II SK plazmidů a poté transformovány do ultrakompetentních bakterií *E. coli*. Z 1400 pozitivních klonů bylo vybráno 65, které obsahovaly repetitivní oblast i obě hraniční oblasti. Primery byly navrženy pouze pro 54 z nich, použitím programu Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Dále bylo u 15 jedinců buňáka havajského metodou *cross-species* PCR amplifikace

testováno 37 již popsaných mikrosatelitů, které byly izolovány od zástupců řádů trubkonosí (Burg, 1999; Techow *et al.*, 2004; Friesen *et al.*, 2006; Bried *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2009; Gonzales *et al.*, 2009), dlouhokřídli (Welch *et al.*, 2011) a pěvci (Friesen *et al.*, 2006). Od dlouhokřídli se jednalo o lokusy RBG18M a RBG29, které byly izolovány od racka novozélandského a od pěvců to byl lokus Dpμ01 izolovaný od lesňáčka žlutonohého. Z celkem 91 testovaných mikrosatelitních lokusů jich bylo 20 označeno jako polymorfních, 10 *de novo* – Ptero01 až Ptero10 se 3 až 10 alelami na lokus a 10 *cross-species* se 3 až 14 alelami na lokus.

Při studiích mimopárové paternity navrhli Quilfeldt *et al.* (2012) celkem 7 mikrosatelitů od buřňáka útlozobého. Genomická DNA byla izolována ze vzorků krve od 43 dospělých jedinců a 34 mláďat a peří od 25 dospělých jedinců s použitím DNAeasy Tissue Kit (QIAGEN). Všechny 7 testovaných primerů bylo polymorfních s 5 až 16 alelami na lokus. Z těchto mikrosatelitů byly však 2 vyloučeny, konkrétně Patbel2 a Patbel5. U Patbel2 bylo detekováno 16 alel, ale z důvodu velké podobnosti některých z nich by mohlo docházet k častějšímu vzniku chyb při hodnocení, a proto byl tento lokus vyřazen. Dále byl vyřazen i mikrosatelitní lokus Patbel5, z důvodu vazby na pohlaví, konkrétně na chromozom Z.

Hardesty *et al.* (2013) charakterizovali celkem 11 polymorfních mikrosatelitů pro buřňáka světlonohého. DNA byla izolována z krve a peří 71 testovaných jedinců za použití QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Dále byla štěpena sedmi restriktázami na fragmenty o délce 300–750 bp. Vzniklé fragmenty byly ligovány do plazmidu pUC19 a zachyceny biotinylovánými magnetickými kuličkami. Pomocí biotinem značených sond byla sestavena genomová knihovna, ze které byly poté izolovány mikrosatelitní lokusy. Klony obsahující mikrosatelity byly poté osekvenovány a amplifikovány metodou PCR. Testy na polymorfismus probíhaly u 90 jedinců buřňáka světlonohého. Detekováno bylo 11 polymorfních mikrosatelitů se 3 až 13 alelami na lokus.

Moodley *et al.* (2015) izolovali 25 nových mikrosatelitních lokusů pro buřňáka útlozobého. Vzorky genomické DNA byly získány od jedinců buřňáka útlozobého. Od dvou jedinců buřňáka útlozobého byla izolována DNA z krve použitím Qiagen DNeasy Tissue Kit (QIAGEN). Izolovány byly pouze sekvence, které obsahovaly mikrosatelity. Po sestavení a následním obohacení genomové knihovny byly izolovány mikrosatelitní sekvence, pro které byly programem Primer 3 (Rozen *et al.*, 2000) navrženy

primery. Celkem bylo testováno na polymorfismus a poté i na *cross-species* PCR amplifikaci 36 mikrosatelitních lokusů. Ke *cross-species* PCR amplifikaci byla použita genomická DNA buřňáka hrdliččího (*Pachyptila turtur*), buřňáka holubího (*P. desolata*), buřňáka širokozobého (*P. vittata*), buřňáka modravého, buřňáka Salvinova (*P. salvini*) a buřňáčka Wilsonova (*Oceanites oceanicus*), který patří do čeledi buřňáčkovití. Testování probíhalo na 4 jedincích buřňáka útlozobého a 3 jedincích buřňáka holubího. Jako polymorfních se u buřňáka útlozobého ukázalo být 26 mikrosatelitních lokusů. Těchto 26 polymorfních mikrosatelitů bylo dále testováno na 77 jedincích buřňáka útlozobého. Bylo detekováno 5 až 48 alel na jeden lokus. Avšak jeden z testovaných mikrosatelitů musel být vyřazen z důvodu vazby na jiné lokusy. Zbylých 25 mikrosatelitů bylo použito pro testy metodou *cross-species* PCR amplifikace pro další již výše zmíněné druhy. U kterých bylo detekováno 2–51 alel na lokus. Nejméně polymorfních lokusů bylo detekováno u buřňáčka Wilsonova, konkrétně 15.

5. Materiál a metody

5.1 Biologický materiál

K analýze byla použita krev od 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Tato krev byla poskytnuta od jedinců pelikána afrického pracovníky ze ZOO Dvůr Králové. Izolace DNA byla provedena fenol-chloroformovou metodou z krve jedinců. Tento krok provedl vedoucí méjí bakalářské práce. Koncentrace izolované DNA se po zředění pohybovala okolo 10 až 60 $\mu\text{g/ml}$.

5.2 PCR amplifikace DNA pelikána afrického

PCR amplifikace byla provedena na DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Ke každé reakci byl použit jeden pár testovaných primerů, které byly přidány do reakční PCR směsi. Složení této reakční PCR směsi je uvedeno v tabulce č. 1. Každá reakční PCR směs byla připravena pro 6 vzorků.

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

Složka reakční PCR směsi	Objem [μl]
Deionizovaná voda	44,4
Reakční pufr pro PCR (10x)	6,7
Roztok MgCl_2 (25 mmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7
Primer R (10 $\mu\text{mol/l}$)	3,3
Primer F (10 $\mu\text{mol/l}$)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5U/ μl)	1,0

Postup práce byl následující:

1. Všechny složky PCR reakční směsi nechat rozmrznout a poté zvortexovat a zcentrifugovat. Do mikroskopavek o objemu 1,5 ml napipetovat složky PCR mixu dle tabulky č. 1. Hotovou PCR reakční směs zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Do každé ze šesti 0,2ml PCR mikroskopavek přidat vždy 9 μl PCR mixu a 1 μl genomické DNA od jednoho jedince pelikána afrického (celkový objem vzorku činí 10 μl).
3. Mikroskopavky se vzorky vložit do termocykléru, aby mohla proběhnout PCR reakce. Tato reakce probíhá následovně podle časového a teplotního profilu:

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

Prvotní PCR reakce probíhala s každým párem primerů podle tohoto schématu, kdy základní použitá teplota annealingu byla 50 °C. V případě potřeby bylo možno teplotu zvýšit nebo snížit. Údaje o změnách teploty pro jednotlivé mikrosatelity viz kapitola Výsledky.

Seznam amplifikovaných mikrosatelitních lokusů u pelikána afrického

Celkem bylo ke *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického použito 213 párů primerů. 207 z nich bylo navrženo pro zástupce z řádu trubkonosí, 1 z nich pro zástupce řádu pěvci a 5 z nich pro zástupce řádu dlouhokřídlí. Mikrosatelity pro pěvce a dlouhokřídlé byly navrženy z důvodu poskytnutí polymorfního produktu u trubkonosých. Seznam jednotlivých mikrosatelitů uvádím v následující tabulce č. 2. a 3.

Tabulka č. 2: Seznam jednotlivých mikrosatelitních lokusů, které pocházely od zástupců z řádu trubkonosí a byly testovány na polymorfismus u pelikána afrického.

Čeď	Zdrojový druh	Lokus	Literární zdroj
albatrosovití (Diomedéidae)	albatros stěhovavý (<i>Diomedea exulans</i>)	7D8, 12C8, 11H7, 10C5, 11H1, 6A3, 12H8, 11F3, 6F12, 12E1	Dubois <i>et al.</i> , 2005
		De1, De2, De3, De7, De11, De12, De17, De18, De25, De30, De33	Burg, 1999
		De35, De37	Burg <i>et</i> Croxall, 2001
	albatros šedohlavý (<i>D. chrysostoma</i>)	Dc5, Dc9, Dc10, Dc16, Dc19, Dc20, Dc21, Dc22, Dc26, Dc27, Dc31	Burg, 1999
	albatros šedohlavý, albatros stěhovavý	D6, D24, D29, D32	
	albatros bělohřbetý (<i>Phoebastria albatrus</i>)	STAL4, STAL8, STAL12, STAL18, STAL20, STAL 24	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
albatros černonohý (<i>P.</i> <i>nigripes</i>)	BFAL4, BFAL11, BFAL14, BFAL19, BFAL20		

Tabulka č.2: Pokračování 1.

Čeď	Zdrojový druh	Lokus	Literární zdroj
albatrosovití (Diomedidae)	albatros laysanský (<i>P. immutabilis</i>)	LAAL1, LAAL7, LAAL10, LAAL19	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
buřňákovití (Hydrobatidae)	buřňáček madeirský (<i>Oceanodroma castro</i>)	Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B	Sun <i>et al.</i> , 2009
	buřňáček dlouhokřídlý (<i>O. leucorhoa</i>)	O110-39 Ole01, Ole02, Ole03, Ole04, Ole05, Ole06, Ole07, Ole08, Ole09, Ole10, Ole11, Ole12, Ole13, Ole14, Ole15, Ole16, Ole17, Ole18, Ole19, Ole20, Ole21, Ole22, Ole23, Ole24, Ole25, Ole26	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
	buřňáček Monteirův (<i>O. monteiroi</i>)	Omn1, Omn2, Omn3, Omn4, Omn6, Omn7, Omn8, Omn11, Omn14, Omn15, Omn16, Omn17, Omn21, Omn22, Omn23, Omn24, Omn25, Omn28	Bried <i>et al.</i> , 2012
buřňákovití (Procellariidae)	buřňák havajský (<i>Pterodroma sandwichensis</i>)	Ptero01, Ptero02, Ptero03, Ptero04, Ptero05, Ptero06, Ptero07, Ptero08, Ptero09, Ptero10	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011
	buřňák taiko (<i>P. magentae</i>)	Tch6, Tch25	Lawrence, 2008
	buřňák trinidadský (<i>P. arminjoniana</i>)	Parm01, Parm02, Parm03, Parm04, Parm05, Parm06	Brown <i>et</i> Jordan, 2009
	buřňák bělobradý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	Paequ2, Paequ3, Paequ4, Paequ7, Paequ8, Paequ10, Paequ13	Techow <i>et</i> O'Ryan, 2004
	buřňák šedý (<i>Calonectris diomedea</i>)	Cd1, Cd2, Cd3, Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd10, Cd11	Bried <i>et al.</i> , 2008

Tabulka č.2: Pokračování 2.

Čeď	Zdrojový druh	Lokus	Literární zdroj
buňákovití (Procellariidae)	buňák baleárský (<i>Puffinus mauretanicus</i>)	Puff 1.5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2F, Puff G11F, Puff PM2, Puff Sma6, Puff G2C	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
	buňák světlonohý (<i>P. carneipes</i>)	Pc A105, Pc A107, Pc A115, Pc B11, Pc B109, Pc B115, Pc C104, Pc D3, Pc D103, Pc D109, Pc D121	Hardesty <i>et al.</i> , 2013
	buňák Bulwerův (<i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb2, Bb3, Bb7, Bb10, Bb11, Bb12, Bb20, Bb21, Bb22, Bb23, Bb25	Andris <i>et al.</i> , 2010
	buňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	Patbel1, Patbel2, Patbel3, Patbel4, Patbel5, Patbel6, Patbel7 Pacbel_00386, Pacbel_02653, Pacbel_03731, Pacbel_04240, Pacbel_04355, Pacbel_04991, Pacbel_07265, Pacbel_08509, Pacbel_08867, Pacbel_08988, Pacbel_09021, Pacbel_09528, Pacbel_09957, Pacbel_10033, Pacbel_10895, Pacbel_12344, Pacbel_15293, Pacbel_15327, Pacbel_16671, Pacbel_16989, Pacbel_17529, Pacbel_17944, Pacbel_17986, Pacbel_19907, Pacbel_20784	Quilfeldt <i>et al.</i> , 2012 Moodley <i>et al.</i> , 2015

Tabulka č. 3: Seznam šesti mikrosatelitních lokusů testovaných u pelikána afrického, které pocházely od zástupců z řádu pěvci a dlouhokřídli a byly polymorfni u některého druhu z řádu trubkonosí.

Zdrojový druh	Cílový druh	Lokus	Literární zdroj
alkovití (Alcidae) alkoun obecný (<i>Cepphus guilemots</i>)	buňák tmavohřbetý (<i>Pterodroma phaeopygia</i>)	Cco5-21	Friesen <i>et al.</i> , 2006
kulíkovití (Charadriidae) kulík mořský (<i>Charadrius alexandrius</i>)	buňák trinidatský (<i>P. arminjoniana</i>)	Calex-01	Brown <i>et Jordan</i> , 2009
rackovití (Laridae) racek novozélandský (<i>Larus novaehollandiae scopulinus</i>)	buňák tmavohřbetý (<i>Pterodroma phaeopygia</i>), buňák taiko (<i>P. magentae</i>)	RBG18	Friesen <i>et al.</i> , 2006; Lawrence, 2008

Tabulka č. 3: Pokračování.

Zdrojový druh	Cílový druh	Lokus	Literární zdroj
rackovití (Laridae) racek novozélandský (<i>Larus novaehollandiae scopulinus</i>)	buňňák havajský (<i>P. sandwichensis</i>)	RBG18M	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011
rackovití (Laridae) racek novozélandský (<i>Larus novaehollandiae scopulinus</i>)	buňňák tmavohřbetý (<i>Pterodroma phaeopygia</i>), buňňák taiko (<i>P. magentae</i>), buňňák havajský (<i>P. sandwichensis</i>)	RBG29	Friesen <i>et al.</i> , 2006; Lawrence, 2008; Welch <i>et</i> Fleischer, 2011
lesňáčkovití (Parulidae) lesňáček žlutohý (<i>Dendroica petechia</i>)	buňňák tmavohřbetý (<i>Pterodroma phaeopygia</i>)	Dpμ01	Friesen <i>et al.</i> , 2006

5.3 Zpracování produktů PCR pomocí elektroforetické separace

Zadaný postup je optimalizován pro použití sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra. Rozměry skel pro tuto komůrku jsou 330 x 390 mm a 330 x 420 mm. Tloušťka gelu je 0,4 mm. Přípravu gelu a proces vyvolávání vzorků je nutné provádět v digestoři.

1. Velké i malé sklo nejprve důkladně omýt vodou a saponátem pomocí kartáčku. Poté obě skla opláchnout deionizovanou vodou, osušit, 2x opláchnout 96% ethanolem a opět osušit papírovou utěrkou.
2. Větší sklo je nutné ošetřit přípravkem, který odpuzuje vodu (Rain-off) a to na ploše, která se bude dotýkat gelu. Po zaschnutí celou plochu skla opláchnout deionizovanou vodou a osušit papírovou utěrkou.
3. Menší sklo, na ploše, na které bude přilepen gel, ošetřit roztokem molekulárního lepidla. Nechat zaschnout a poté opláchnout 96% ethanolem a usušit papírovou utěrkou, 3x zopakovat.
4. Větší sklo umístit na polystyrenovou desku v digestoři ošetřenou plochou nahoru. Po stranách umístit dva spacery o tloušťce 0,4 mm. Na spacery položit menší sklo, ošetřenou plochou dolů. Spaceru umístit na kraj skla, gumu spaceru přitlačit k menšímu sklu, aby se guma spaceru a menší sklo dotýkaly. Hrany obou skel jsou na jedné straně v zákrytu, na druhé straně jsou od sebe posunuty cca o 2,5 cm. V místě spacerů sepnout skla k sobě pomocí 2 klipsů na každé straně.

5. Následně v kádince připravit 6% polyakrylamidový gel. Připravený roztok pomalu nalévat mezi skla na straně, kde jsou skla vzájemně posunuta, druhou rukou lehce poklepávat na sklo, aby nevznikly bubliny.
6. Po vyplnění prostoru gelem mezi skly v místě nalévání zasunout hřebínek rovnou stranou mezi skla asi 0,7 až 1 cm hluboko. V místě hřebínku skla sepnout k sobě čtyřmi klipsy a nechat hodinu tuhnout.
7. Po ztuhnutí gelu odstranit klipsy, skla omýt vodou a kartáčkem odstranit zbytky gelu v okolí hřebínku. Menší sklo poté usušit papírovou utěrkou a upevnit do elektroforetické komůrky tak, aby plocha menšího skla směřovala k hliníkové desce komůrky. Hřebínek musí být umístěn v horní části.
8. Anodový i katodový prostor zalít 0,5x TBE pufrem, poté vytáhnout hřebínek. Vzniklý prostor mezi skly vyčistit pufrem pomocí injekční stříkačky. Anodový i katodový prostor následně uzavřít, připojit elektrody ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu a 30 minut zahřívat gel při nastavení 90 W, 3000 V a 150 mA.
9. Během nahřívání gelu si připravit vzorky. Ke každému PCR produktu přidat 5 μ l nanášecího pufru, následně vložit na 3 minuty do termocykleru a denaturovat při 94 °C. Po třech minutách vyjmout mikrozkušavky a vložit do nádoby s ledem, aby nedošlo k renaturaci denaturovaných vláken DNA produktů.
10. Během denaturace vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit elektrody a znovu pomocí injekční stříkačky a pufru vyčistit prostor mezi skly. Do tohoto prostoru vložit hřebínek a zasunout zoubky asi 1 mm hluboko do gelu.
11. Osmikanálovou pipetou nanášet 2 μ l vzorků do mezer mezi zoubky hřebínku. Po nanesení všech vzorků znovu připojit elektrody a zapnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu. Tentokrát nastavit výkon na 70 W, 3000 V a 150 mA. Doba trvání elektroforetické separace se liší podle molekulové hmotnosti vzorků. Separace tedy může trvat 1,5–2 hodiny.
12. V průběhu elektroforetické separace si připravit vzorky k vyvolávání - fix/stop roztok, 1% HNO₃ a vývojku. Vývojku pořádně protřepat a umístit do chladničky.
13. Po ukončení elektroforetické separace vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit elektrody, vypustit pufr, skla s gelem vyjmout a položit na misku menším sklem nahoru. Z prostoru mezi skly vytáhnout spacers i hřebínek a pomocí nože od sebe odlepit skla.

14. Menší sklo s gelem vložit do fotomisky gelem nahoru. Fotomisku umístit na třepačku, zalít fix/stop roztokem a nechat působit 20 min.
15. Po dvaceti minutách fix/stop roztok slít zpět do Erlenmayerovy baňky a sklo s gelem promýt deionizovanou vodou - 3x. Poté fotomisku opět vložit na třepačku a promývat 4 minuty roztokem 1% HNO₃.
16. Poté roztok a sklo s gelem promýt 4x deionizovanou vodou. Fotomisku s gelem vložit zpět na třepačku, zalít 0,1% roztokem AgNO₃, do kterého bylo přidáno 1200 µl formaldehydu. Nechat působit cca 30 minut a poté slít zpět do Erlenmayerovy baňky.
17. Mezitím připravit fotomisku s deionizovanou vodou, do které se po uplynutí 30 minut vloží na cca 5 vteřin sklo s gelem. Následně vložit do fotomisky s vývojkou, do které bylo přidáno 1200 µl formaldehydu a 160 µl 1% Na₂S₂O₃ a umístit na třepačku.
18. Sledovat vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů. Pokud jsou proužky dostatečně zřetelné, zalít fix/stop roztokem, aby se zastavilo vyvíjení.
19. Roztok necháme působit cca 2 minuty, poté vylít a sklo s gelem vložit do fotomisky s deionizovanou vodou.
20. Sklo s gelem potom cca po 5 minutách přenést do sušárny na cca 30 minut při 90 °C.
21. Po vysušení vyhodnotit gel pomocí negatoskopu.
22. Vyhodnocený gel, který už nebude potřeba, odlepit pomocí roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/dm³. Sklo poté umýt vodou a saponátem a nechat osušit, aby bylo možné ho znovu použít.

5.4 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/µl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l, 400 µl každého), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma)

- Ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N'-methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Rain off - tekuté stěrače (Sheran)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

5.5 Použité roztoky

Akrylamid, 6% zásobní roztok:

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

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok:

- 0,8 g dusičnanu stříbrného
- 800 ml deionizované vody
- před použitím přidat 1200 µl formaldehydu

Fix/stop roztok:

- 80 ml ledové kyseliny octové

- 800 ml deionizované vody

Kyselina dusičná, 1% roztok:

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

Nanášecí pufr pro elektroforetickou separaci:

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

Peroxodisíran amonný, 10% roztok:

- 1 g peroxodisíranu amonného
- 10 ml deionizované vody
- uchovávat v chladničce

Polyakrylamidový gel, 6% roztok:

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

Reakční pufr pro PCR, 10x

- 80 ml deionizované vody
- 1,211 g Tris
- pH upravit pomocí HCl na hodnotu 9
- 3,73 g KCl
- 1 ml Triton X-100
- po rozpuštění doplnit na 100 ml

Roztok hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/dm³:

- 40 g hydroxidu sodného
- 1 l deionizované vody

Roztok molekulárního lepidla:

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

TBE pufr, 10x zásobní roztok:

- 55 g kyseliny borité
- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 40 ml roztoku disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny 0,5 mol/l, pH 8,0

- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Vývojka:

- 24 g uhličitanu sodného
- 800 ml deionizované vody
- uložit do chladničky
- před použitím přidat 1200 µl formaldehydu a 160 µl thiosíranu sodného

5.6 Seznam používaných laboratorních přístrojů

- 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 až 10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl až 1 ml (ThermoLab - systems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler TC XP (BIOER)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

6. Výsledky

V experimentální části mé bakalářské práce jsem používala metodu *cross-species* PCR amplifikace, kde jsem na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) testovala polymorfismus 213 párů primerů. Celkem 207 z nich bylo izolováno od zástupců z řádu trubkonosí (Procellariiformes) – 100 mikrosatelitů navrženo od zástupců z čeledi buňňákovití (Procellariidae), 54 od zástupců z čeledi buňňáčkovití (Hydrobatidae) a 53 od zástupců z čeledi albatrosovití (Diomedidae). Dalších pět mikrosatelitů, které byly polymorfní u trubkonosých, pocházelo od zástupců řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) – jeden z čeledi alkovití (Alcidae), jeden z čeledi kulíkovití (Charadriidae) a tři z čeledi rackovití (Laridae). Jeden mikrosatelit pocházel od zástupce z řádu pěvci (Passeriformes) z čeledi lesňáčkovití (Parulidae).

Všech 213 lokusů jsem nejprve testovala při teplotě annealingu 50 °C. V případě neposkytnutí PCR produktu nebo špatné viditelnosti produktu po vizualizaci byla teplota annealingu snižována až na 44 °C. V opačném případě, kdy byl produkt po vizualizaci příliš tmavý nebo tvořil nehodnotitelnou skvrnu, teplota annealingu byla zvyšována až na 60 °C, aby se výsledek dal vyhodnotit. Všechny mikrosatelity, které poskytly monomorfní produkt jsem vyřadila a už jsem se jimi dále nezabývala. Mikrosatelity, které poskytly polymorfní produkt jsem dále testovala, abych určila optimální podmínky PCR amplifikace a čas následné elektroforetické separace. Jako poslední jsem u některých mikrosatelitů optimalizovala koncentraci hořčnatých iontů v PCR mixu, kdy počáteční koncentrace byla 1,42 mmol/l. Konkrétně u mikrosatelitu Patbel3 byla použita pouze tříčtvrteční koncentrace MgCl₂ (1,07 mmol/l). Po správné optimalizaci jsem získala počet alel a genotyp u jednotlivých jedinců.

Analýzou všech 213 testovaných mikrosatelitů bylo 24 polymorfních, 184 monomorfních a 5 neposkytlo žádný produkt (Bb10, De7, Ole08, Parm05 a Ptero02) i přes několikeré opakování PCR amplifikace. U 24 polymorfních mikrosatelitů byly pozorovány 2 až 3 alely. V tabulce č. 4 je uvedeno všech 24 polymorfních mikrosatelitů, včetně optimalizovaných podmínek elektroforetické separace a teploty annealingu.

Tabulka č. 4: Charakteristika 24 polymorfních mikrosatelitů, které byly testovány u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického, v tabulce je uveden název mikrosatelitu s kódem z databáze GenBank, zdrojový druh, jednotka repetice, sekvence primerů, počet alel (N), teplota annealigu (T_A) a čas elektroforetické separace (ELFO).

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Zdrojový druh	Jednotka repetice	Sekvence primerů (5' → 3')	N	T _A [°C]	ELFO [min]
De17 (AF096798)	albatros stěhovavý	CA	F: TCTCAGGCCCTTGTCCTAAC R: AAAATGGTCCCACAGAGCAC	2	47	90
De9 (AF096793)	albatros šedohlavý	AC	F: CGTGGTATATAGCTTATGGGCA R: GAGATTGTACTCCTGGGGCA	2	50	120
STAL18 (neuvedeno)	albatros bělohřbetý	ATG	F: CAGTTCCAAAGAAGGAAAACC R: GTTTGGAGTGGTCTTGGGTACAGC	2	55	90
BFAL4 (neuvedeno)	albatros černonohý	TC	F: TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R: GTTTGCCATTTTAAACTGTCATTGGC	2	58	90
LAAL7 (neuvedeno)	albatros laysanský	AGC	F: CAGCATGACCAAATCCATCC R: GTTTGGACACAAATGCCGTTCTTG	2	56	120
Ole21 (FR696397)	buňáček dlouhokřídlý	GA/A/GAAA	F: CCACGAGAAATGGACATACAAC R: TGAAGAACTTCCGAAATAACTGTG	2	58	90
Ole22 (FR696398)		CT	F: AGCAGAGGCCACTACATCAC R: AAATATCATAGGGGAGTAAAGAGC	2	50	90
Ole26 (FR696402)		TG	F: TCAGCTTCTGGTGCAGTTATG R: TCCTGCTGATGGATAGGTTATG	2	50	90
Omn2 (JQ303227)	buňáček Monteirův	AC/AT	F: ATTCGTCTTGCTTCCAAA R: ACAAATAACCAGGATTGATAATA	2	50	120
Omn8 (JQ303232)		AC	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTAATA	3	49	90
Omn23 (JQ303240)		TTG	F: GGAAAAGGAGACTAGATCTTGTGAA R: AACTTACTTTGTTATTTCCATATGTTT	2	50	90

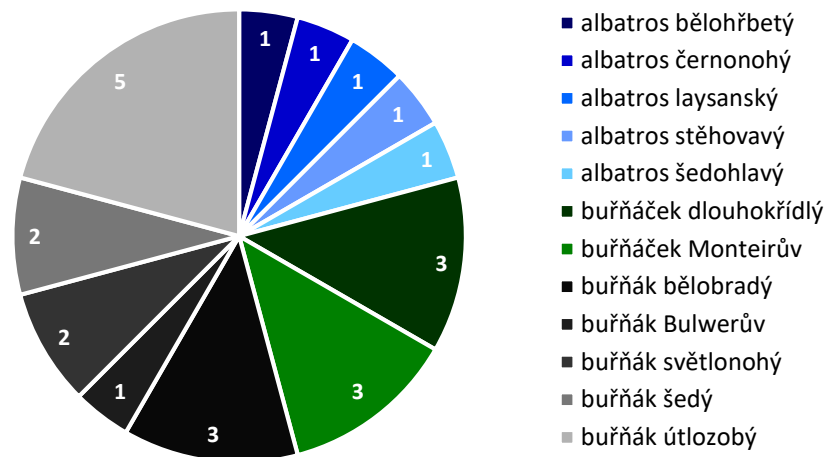
Tabulka č. 4: Pokračování.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Zdrojový druh	Jednotka repeticce	Sekvence primerů (5' → 3')	N	T _A [°C]	ELFO [min]
Paequ2 (AY371070)	buňák bělobradý	CA	F: GCCTACTCCATCTTAATTGTG R: GGTTTCATACAGTTTCCTAGGTC	3	53	120
Paequ3 (AY371071)		GA	F: TGTGGGTGCAGTAGAGCA R: CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	3	54	120
Paequ8 (AY371074)		CA	F: TATTCTGAGACTTGCGTTATCC R: GTGATCCATTAGTTGATGTCTACTG	2	53	120
Cd3 (EU029085)	buňák šedý	GT/CT	F: TTGCCTCTTTTACAGGACTGC R: TCCCTGTGGCTAAGGATCTG	2	56	120
Cd5 (EU029087)		GT/AT	F: CTGCACAGACTGAGAGTATAAGATTC R: GGCTTAAAGGGTAAATACACATGG	2	50	90
Pc A107 (JX435472)	buňák světlonohý	CA	F: AAAGCCAGTAGGTGTATTCAAC R: AAGTGGGAGGAAAGAGTGTAG	2	48	90
Pc B109 (JX435475)		CAA	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATTGAGGATGTAGGTTC	2	58	120
Bb25 (HM171901)	buňák Bulwerův	AC	F: GCATCCCTGGA ACTCTGATT R: GAATGAACCAGCCAGAAGGT	2	60	120
Patbel2 (JF288776)	buňák útlozobý	CT/AT	F: GGTGTCATGCAACTGACTGAA R: CAATGGGAATGGCAGAGACT	2	52	90
Patbel3 (JF288777)		CT/AT	F: CCTTCCCTAGAGCAATGGAG R: TGCACACACTGAAAGAGGACA	3	50	90
Pacbel 00386 (neuvedeno)		AC	F: CATGTCTACAAACAAGCACG R: TCACTGGAAACCAGAGTAGGC	2	53	90
Pacbel 08988 (neuvedeno)		CT	F: CTGATCGGTTGTGCTCTGTG R: GCGGAAAGATCCTAACAAGCC	2	50	90
Pacbel 10033 (neuvedeno)		TG	F: CAACGCGCTTTTGGTTTTGC R: GGCCACTCACCACAATACAAG	2	46	90

Z 24 mikrosatelitních lokusů, které byly polymorfní u pelikána afrického jich bylo nejvíce izolováno od zástupců z čeledi buňňákovití (13) a nejméně z čeledi albatrosovití (5). Od zástupců z čeledi buňňáčkovití bylo izolováno celkem 6 mikrosatelitů, které poskytly polymorfní produkt u pelikána afrického. Od zástupců z řádu dlouhokřídlí a pěvci nebyl nalezen žádný polymorfní lokus.

Celkem bylo u pelikána afrického testováno 213 mikrosatelitů, 24 z nich bylo vyhodnoceno jako polymorfních. Úspěšnost nalezení polymorfního lokusu tedy odpovídá 11,3 %. Od čeledi buňňákovití bylo ze 100 testovaných mikrosatelitů nalezeno 13 polymorfních, což odpovídá úspěšnosti 13 %. Od druhu buňňák útlozobý jsem našla nejvyšší počet polymorfních mikrosatelitů, kdy bylo polymorfních 5 z 32 lokusů. Úspěšnost u tohoto druhu však není příliš vysoká, protože byl testován relativně velký počet lokusů. Naopak druhu buňňák bělobradý jsem našla ze 7 testovaných lokusů 3 polymorfní, což odpovídá poměrně vysoké úspěšnosti nalezení polymorfního lokusu, a to 43 %. Úspěšnost je zde sice více než 3x vyšší, než byl průměr pro druhy čeledi buňňákovití, ale vychází pouze z velmi malého počtu testovaných lokusů. Od čeledi buňňáčkovití bylo nalezeno 6 mikrosatelitů z celkem 54 testovaných. Úspěšnost činila v tomto případě 11,1 %. Nejméně polymorfních mikrosatelitů bylo nalezeno od zástupců z čeledi albatrosovití (5), celkem jich bylo testováno 53, což odpovídá úspěšnosti 9,4 %. V následujícím grafu uvádím všech 24 nalezených polymorfních lokusů u pelikána afrického rozdělených podle čeledí a podle druhů, od kterých byly izolovány.

Graf č. 1: Rozdělení 24 polymorfních mikrosatelitních lokusů nalezených u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického pomocí *cross-species* PCR amplifikace. Mikrosatelitní lokusy jsou rozděleny podle zdrojového druhu. Druhy z čeledi albatrosovití jsou vyznačeny modře, druhy z čeledi buřňáčkovití zeleně a druhy z čeledi buřňákovití šedě. U každého druhu je uveden počet nalezených polymorfních mikrosatelitů.



U všech 24 nalezených polymorfních mikrosatelitních lokusů jsem detekovala 2 nebo 3 alely. U většiny mikrosatelitních lokusů, konkrétně dvaceti, bylo nalezeno po 2 alelách. U zbylých čtyř mikrosatelitů bylo detekováno po 3 alelách. Co se týče procentuálního rozdělení, 2 alely byly detekovány u 83 % polymorfních mikrosatelitů a 3 alely u 17 % polymorfních mikrosatelitních lokusů. U každého polymorfního mikrosatelitního lokusu, který byl nalezen u šesti nepříbuzných jedinců pelikána afrického byly vyhodnoceny genotypy všech 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického viz Tabulka č. 5.

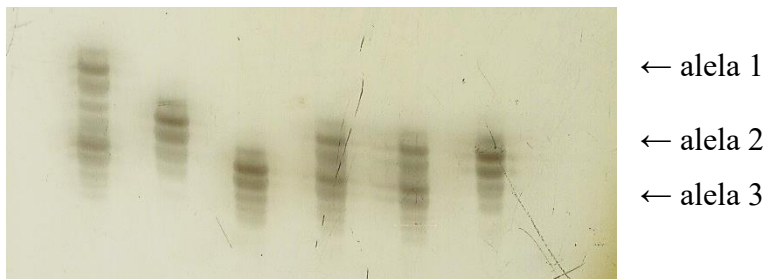
Tabulka č. 5: Genotypy 24 polymorfních mikrosatelitních lokusů nalezených u šesti nepříbuzných jedinců pelikána afrického metodou *cross-species* PCR amplifikace. V tabulce je uveden název mikrosatelitu, zdrojový druh, počet alel a genotyp.

Mikrosatelit	Zdrojový druh	Počet alel	Genotypy
De17	albatros stěhovavý	2	1/1 1/2 1/1 2/2 1/2 1/1
Dc9	a. šedohlavý	2	1/2 1/2 2/2 2/2 1/2 1/2
STAL18	a. bělohřbetý	2	1/2 2/2 2/2 1/2 1/1 2/2
BFAL4	a. černonohý	2	1/1 1/1 2/2 2/2 1/1 2/2
LAAL7	a. lasanský	2	2/2 2/2 1/2 2/2 1/2 2/2
Ole21	buňáček dlouhokřídlý	2	2/2 2/2 1/2 2/2 2/2 2/2
Ole22		2	1/2 1/1 1/1 1/1 1/2 1/2
Ole26		2	2/2 2/2 1/1 1/1 2/2 1/1
Omn2	b. Monteirův	2	2/2 2/2 2/2 1/1 2/2 1/2
Omn8		3	1/3 2/2 3/3 2/3 2/3 2/2
Omn23		2	2/2 2/2 1/2 2/2 2/2 2/2
Paequ2	buňák bělobradý	3	1/3 1/1 1/1 1/1 1/2 1/3
Paequ3		3	1/3 2/3 3/3 1/3 3/3 1/3
Paequ8		2	1/1 2/2 2/2 1/1 1/2 2/2
Cd3	b. šedý	2	2/2 1/2 1/1 1/2 1/1 1/2
Cd5		2	1/2 2/2 2/2 2/2 2/2 2/2
Pc A107	b. světlonohý	2	2/2 2/2 2/2 1/2 1/2 2/2
Pc B109		2	2/2 2/2 1/1 2/2 1/2 2/2
Bb25	b. Bulwerův	2	2/2 2/2 1/1 2/2 1/2 1/2
Patbel2	b. útlozobý	2	2/2 1/2 1/2 1/2 1/2 1/1
Patbel3		3	1/1 2/3 3/3 2/3 2/2 1/2
Pacbel 00386		2	1/2 1/2 1/1 1/2 1/1 1/2
Pacbel 08988		2	2/2 2/2 2/2 2/2 1/2 2/2
Pacbel 10033		2	1/2 1/2 1/1 1/2 1/2 1/2

Zjistila jsem, že u 5 lokusů (BFAL4, Cd3, Ole26, Omn2 a Patbel3) by mohla být vazba na pohlaví (na Z chromozom). Všechny samice totiž vykazují homozygotní genotyp. Potvrzení nebo vyvrácení tohoto předpokladu bude možné v budoucnu otestováním většího množství jedinců.

V rámci hodnocení výsledků byly pořízeny fotografie všech gelů. Na následujících fotografiích elektroforetogramů jsou viditelné vybrané mikrosatelitní lokusy po provedení *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Konkrétně se jedná o mikrosatelit Omn8 (Obrázek č. 2) a Cd5 (Obrázek č.3).

Obrázek č. 2: Elektroforetogram mikrosatelitu Omn8 testovaného u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického, u tohoto lokusu byly nalezeny 3 alely, které jsou v obrázku vyznačeny šipkami. PCR proběhla při teplotě annealingu 49 °C a doba elektroforetické separace byla 90 min.



Obrázek č. 3: Elektroforetogram mikrosatelitu Cd5 testovaného u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického, u tohoto lokusu byly nalezeny 2 alely, které jsou v obrázku označeny šipkami. PCR proběhla při teplotě annealingu 50 °C a doba elektroforetické separace byla 90 min.



7. Diskuze

V této bakalářské práci jsem metodou *cross-species* PCR amplifikace testovala celkem 213 mikrosatelitních lokusů na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). 207 mikrosatelitů pocházelo od zástupců řádu trubkonosí, u kterých byly tyto mikrosatelitní lokusy vyhodnoceny jako polymorfní. Zbylých 6 lokusů bylo polymorfních u některých druhů z řádu trubkonosí a tyto lokusy původně pocházejí od ptáků z řádů dlouhokřídlí a pěvci. Ze všech 213 testovaných mikrosatelitů jsem našla 24 polymorfních s četností 2–3 alely na lokus.

Od zástupců z čeledi albatrosovití jsem testovala 53 mikrosatelitních lokusů. U pelikána afrického došlo k amplifikaci a tvorbě polymorfního produktu u 5 z nich. Jednalo se o lokus LAAL7 izolovaný od albatrosa laysanského (*Phoebastria immutabilis*), De17 od albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), Dc9 od albatrosa šedohlavého (*D. chrysostoma*), STAL 18 od albatrosa bělohřbetého (*P. albatrus*) a BFAL4 od albatrosa černonohého (*P. nigripes*). U těchto pěti mikrosatelitů byly detekovány 2 alely na lokus.

Burg (1999) popsala 26 mikrosatelitních lokusů od albatrosa stěhovavého a albatrosa šedohlavého. Já jsem metodou *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického našla 2 polymorfní lokusy. Mikrosatelity byly amplifikovány metodou PCR, při které autorka použila 2 různé teploty annealingu. Při teplotě T_{A1} probíhalo prvních 7 cyklů PCR reakce a při teplotě T_{A2} probíhalo dalších 25 cyklů. Testování probíhalo na 90 jedincích albatrosa stěhovavého a 50 jedincích albatrosa šedohlavého. Při testování těchto mikrosatelitů na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického jsem u 2 lokusů z 26 detekovala polymorfismus. Mikrosatelit Dc9 byl původně popsán pro albatrosa šedohlavého, při testování na 50 jedincích tohoto druhu autorka našla 5 alel při teplotě T_{A1} 50 °C a T_{A2} 54 °C. Metodou *cross-species* PCR amplifikace u pelikána afrického jsem detekovala 2 alely při teplotě annealingu 50 °C. Mikrosatelit De17 byl původně navržen pro albatrosa stěhovavého. Autorka při testování na 90 jedincích tohoto druhu použila k amplifikaci T_{A1} 48 °C a T_{A2} 52 °C, avšak nedetekovala žádnou polymorfni oblast. Při *cross-species* PCR amplifikaci u pelikána afrického jsem našla 2 alely, při použité teplotě annealingu 47 °C. Všechny 26 lokusů autorka otestovala metodou *cross-species* PCR amplifikace u 90 jedinců albatrosa černobrvého, v případě

lokusu Dc9 detekovala 7 alel a amplifikací mikrosatelitu De17 našla 4 alely na lokus.

Hernandez *et al.* (2014) popsali celkem 15 polymorfních mikrosatelitů u albatrosa černonohého, laysanského a bělohřbetého (počty testovaných jedinců autoři neuvádějí). Já jsem u pelikána afrického metodou *cross-species* PCR amplifikace našla 3 polymorfní lokusy. U všech testovaných lokusů použili stejnou teplotu annealingu T_A 60 °C. Mikrosatelit BFAL4 byl původně navržen pro albatrosa černonohého, testování probíhalo na 36 jedincích tohoto druhu a bylo detekováno 8 alel, při *cross-species* PCR amplifikaci tohoto lokusu u albatrosa laysanského autoři našli 4 alely a u albatrosa bělohřbetého 2 alely. U pelikána afrického jsem našla 2 alely a použila teplotu annealingu 58 °C. Mikrosatelit LAAL7 byl původně navržen pro albatrosa laysanského a testování probíhalo na 12 jedincích tohoto druhu. Lokus autoři označili za polymorfní a obsahoval 4 alely, stejně jako při testování tohoto lokusu u albatrosa černonohého. U albatrosa bělohřbetého našli pro tento lokus 2 alely. Při testování tohoto mikrosatelitu u pelikána afrického opět metodou *cross-species* PCR amplifikace jsem našla 2 alely a teplota annealingu byla 56 °C. Mikrosatelitní lokus STAL18 byl původně izolován pro albatrosa bělohřbetého, testování probíhalo u 3 jedinců a nebyla nalezena žádná oblast polymorfismu, proto byl tento mikrosatelit autory označen za monomorfní. Při *cross-species* PCR amplifikaci u albatrosa černonohého i albatrosa laysanského našli 7 alel. Při testování tohoto lokusu u pelikána afrického jsem detekovala 2 alely při použití teploty annealingu 55 °C.

Od druhů z čeledi buřňáčkovití jsem testovala 54 mikrosatelitních lokusů. Při testování těchto mikrosatelitů metodou *cross-species* PCR amplifikace u pelikána afrického jsem našla 6 polymorfních lokusů. Konkrétně Omn2, Omn8 a Omn23 původně navržené pro buřňáčka Monteirova (*Oceanodroma monteiroi*) a Ole21, Ole22 a Ole26, které byly původně navrženy pro buřňáčka dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*). Co se týče počtu alel, našla jsem 2–3 alely na lokus.

Bicknell *et al.* (2011) popsali 26 polymorfních mikrosatelitů pro buřňáčka dlouhokřídlého. Testováno bylo celkem 24 jedinců. Já jsem u pelikána afrického použitím metody *cross-species* PCR amplifikace našla 3 polymorfní lokusy. Pro mikrosatelit Ole21 při testování zdrojového druhu autoři detekovali 21 alel za použití teploty annealingu T_A 60 °C. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického jsem detekovala 2

alely při T_A 58 °C. Na lokusu Ole22 autoři při testování na zdrojovém druhu našli 3 alely při stejné T_A jako u lokusu Ole21. Metodou *cross-species* PCR amplifikace jsem našla 2 alely a T_A byla 50 °C. Třetí polymorfni lokus, který jsem našla u pelikána afrického obsahoval rovněž 2 alely a T_A byla také 50 °C. Jednalo se o mikrosatelit Ole26, který autoři při testech na zdrojovém druhu našli také polymorfni se 2 alelami a použitá T_A byla 60 °C.

Bried *et al.* (2012) charakterizovali 18 polymorfni mikrosatelitních lokusů pro buňňáčka Monteirova. Já jsem u pelikána afrického našla 2 polymorfni mikrosatelity. Pro všechny testované mikrosatelity použili v PCR stejnou teplotu annealingu T_A 58 °C. Autoři použili k testování genomickou DNA 125 jedinců buňňáčka Monteirova. Na lokusu Omn2 detekovali autoři 7 alel. Použitím *cross-species* PCR amplifikace u pelikána afrického jsem našla 2 alely při použité teplotě annealingu 50 °C. Jako další polymorfni lokus byl označen mikrosatelit Omn8, který u pelikána afrického poskytl 3 alely při T_A 49 °C. Testováním na zdrojovém druhu autoři detekovali 10 alel. Použitím *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického byl polymorfni i lokus Omn23, který měl 2 alely při T_A 50 °C. Amplifikací u zdrojového druhu autoři našli 4 alely a tento lokus označili jako vázaný na pohlaví, konkrétně na chromozom Z. Těchto 18 mikrosatelitů pomocí *cross-species* PCR amplifikace autoři testovali i u dalších 3 druhů, konkrétně u buňňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*), buňňáčka modravého (*Halobaena caerulea*) a buňňáčka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), poslední dva druhy patří do čeledi buňňákovití. Mikrosatelity Omn2 a Omn8 byly polymorfni pouze u buňňáčka madeirského, v případě Omn2 byly detekovány 3 alely a u Omn8 6 alel. Lokus Omn23 byl u buňňáčka madeirského monomorfni a u zbylých dvou testovaných druhů nedošlo k poskytnutí produktu.

Od zástupců čeledi buňňákovití jsem testovala 100 mikrosatelitů. Při testování těchto mikrosatelitů metodou *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického jich bylo nalezeno 13 polymorfni. Konkrétně Bb25, který byl původně navržen pro buňňáčka Bulwerova. Dále mikrosatelity Cd3 a Cd5 původně navržené pro buňňáčka šedého, Patbel2, Patbel3, Pacbel 00386, Pacbel 08988 a Pacbel 10033 původně popsány pro buňňáčka útlozobého, Pc A107 a Pc B109 původně navržené pro buňňáčka světlonohého a Paequ2, Paequ3 a Paequ 8, které byly původně popsány pro buňňáčka bělobradého. U všech těchto polymorfni mikrosatelitů jsem detekovala 2–3

alely na lokus.

Techow *et* O'Ryan (2004) popsali celkem 7 mikrosatelitů pro buřňáka bělobradého. Při *cross-species* PCR amplifikaci u pelikána afrického jsem 3 z těchto 7 lokusů označila jako polymorfní, čemuž odpovídala také vysoká úspěšnost nalezení polymorfního lokusu, a to 43 %. Lokus Paequ2 měl 3 alely a teplota annealingu byla 53 °C. U zdrojového druhu autoři u tohoto lokusu našli 4 alely a byla použita T_A 54 °C. Mikrosatelit Paequ3 měl u pelikána afrického 3 alely a T_A byla 54 °C. V případě testování u zdrojového druhu autoři detekovali 9 alel za použití T_A 55 °C. Třetím polymorfním lokusem byl Paequ8 se 3 alelami a T_A 53 °C. U zdrojového druhu autoři našli 3 alely a použitá teplota annealingu byla 58 °C. Všechny 7 mikrosatelitů testovali metodou *cross-species* PCR amplifikace u dalších 6 druhů: buřňák tristanský (*Procellaria conspicillata*) (5 jedinců), buřňák obrovský (*Macronectes giganteus*) (5), buřňák Hallův (*M. hallis*) (6) a 3 druhy z čeledi albatrosovití – albatros černobrvý (*Thalassarche melanophris*) (6), albatros šedohlavý (*T. chrysostoma*) (6) a albatros stěhovavý (*Diomedea exulans*) (6). Mikrosatelit Paequ2 byl nalezen polymorfní u 4 z těchto druhů – buřňák tristanský, albatros černobrvý a albatros šedohlavý, Paequ3 byl polymorfní u všech testovaných druhů kromě albatrosa stěhovavého a Paequ8 byl polymorfní u 2 z celkových 6 testovaných (buřňák tristanský a albatros šedohlavý). Počty alel autoři neuvádějí.

Bried *et al.* (2008) popsali celkem 11 polymorfních mikrosatelitů pro buřňáka šedého. Teplotu annealingu zvolili pro všechny mikrosatelity stejnou a to 58 °C. Celkem probíhalo testování na 43 jedincích zdrojového druhu. Lokus Cd3 měl 5 alel a lokus Cd5 6 alel. Při testování těchto mikrosatelitů u pelikána afrického jsem pro lokus Cd3 našla 2 alely a teplota annealingu byla 56 °C a lokus Cd5 měl také 2 alely, ale T_A byla 50 °C. Tyto mikrosatelity autoři testovali také metodou *cross-species* PCR amplifikace u dalších 3 druhů – buřňák bělobradý a buřňák Bulwerův a z čeledi albatrosovití albatros stěhovavý. Mikrosatelit Cd3 byl polymorfní u buřňáka Bulwerova a lokus Cd5 byl nebyl polymorfní ani u jednoho ze tří testovaných druhů.

Andris *et al.* (2010) charakterizovali celkem 11 polymorfních mikrosatelitů pro buřňáka Bulwerova. Pro lokus Bb25 použili teplotu annealingu 58 °C a našli u něj 6 alel. Při testování metodou *cross-species* PCR amplifikace u pelikána afrického jsem detekovala 2 alely při T_A 60 °C. Tento lokus autoři testovali metodou *cross-species* PCR amplifikace i u dalších 3 druhů. U buřňáčka Monteirova z čeledi buřňáčkovití byl

monomorfní, u buňáka modravého a buňáka bělobradého byl polymorfní. Počty alel autoři neuvádějí.

Quillfeldt *et al.* (2012) popsali 7 mikrosatelitních lokusů u buňáka útlozobého. Testování probíhalo celkem na 68 jedincích buňáka útlozobého. Při testování *cross-species* PCR amplifikace u pelikána afrického jsem našla polymorfní lokus Patbel2 a Patbel3. Na lokusu Patbel2 jsem detekovala 2 alely při teplotě annealingu 52 °C. Při testování na zdrojovém druhu autoři našli 16 alel. Tento mikrosatelit však autoři nezahrnuli do analýzy paternity, jelikož nalezené alely tohoto mikrosatelitu byly velikostně podobné, a tedy problematicky identifikovatelné, což by mohlo vést ke zvýšené frekvenci výskytu chyb při hodnocení elektroforetogramu. Pro lokus Patbel3 jsem našla 3 alely za použité T_A 53 °C, při testování na zdrojovém druhu autoři našli 10 alel.

Hardesty *et al.* (2013) popsali 11 polymorfních mikrosatelitů pro buňáka světlonohého. Testování těchto mikrosatelitů probíhalo na 84 jedincích buňáka světlonohého. Pro lokus Pc A107 autoři detekovali 5 alel při T_A 55 °C. Při testování tohoto mikrosatelitu u pelikána afrického metodou *cross-species* PCR amplifikace jsem našla 2 alely při T_A 48 °C. U mikrosatelitu Pc B109 autoři detekovali 5 alel při T_A 57 °C při testování na zdrojovém druhu, u pelikána afrického jsem našla 2 alely za použité T_A 58 °C.

Moodley *et al.* (2015) charakterizovali celkem 25 mikrosatelitů pro buňáka útlozobého, kdy k testování bylo použito 77 jedinců. Já jsem při testování těchto mikrosatelitů u pelikána afrického našla 3 polymorfní mikrosatelity. Při amplifikaci autoři použili stejnou teplotu annealingu pro všech 25 mikrosatelitů, a to 56 °C. Pro lokus Pacbel 00386 jsem u pelikána afrického při T_A 53 °C našla 2 alely, u zdrojového druhu autoři detekovali 11 alel. V případě mikrosatelitu Pacbel 08988 jsem našla rovněž 2 alely ($T_A = 50$ °C) a autoři u zdrojového druhu detekovali 17 alel. U mikrosatelitu Pacbel 10033 byly při testování u pelikána afrického nalezeny 2 alely při T_A 46 °C, autoři uvádějí pro tento lokus 19 alel. Těchto 25 mikrosatelitních lokusů autoři dále testovali na 5 druzích z čeledi buňákovití a buňáčkovití metodou *cross-species* PCR amplifikace. Pro testování byli použiti jedinci druhu buňák holubí, buňák širokozobý, buňák Salvinův, buňák hrdliččí, buňák modravý a jeden druh z čeledi buňáčkovití, buňáček Wilsonův. Lokus Pacbel 08988 a Pacbel 10033 byly polymorfní u všech 5 druhů s počtem 2 až 12

alel na jeden lokus. Mikrosatelit Pacbel 00386 byl označen za monomorfní u buňňáčka Wilsonova, u zbylých 4 druhů byl polymorfní se 2 až 13 alelami na lokus.

V Laboratoři populační genetiky KBB Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci je výzkum zaměřen na testování mikrosatelitů metodou *cross-species* PCR amplifikace druhů kladu *Aequorlitorornithes* (Prum *et al.*, 2015). Své výsledky jsem porovnávala s dalšími pracemi, ve kterých jejich autorky testovaly stejné mikrosatelity jako já na dalších druzích vodních ptáků z kladu *Aequorlitorornithes*.

Janušová (2015) testovala všech 213 mikrosatelitů na potápce roháči (*Podiceps cristatus*) z řádu potápky pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace. V této práci našla autorka 20 polymorfních mikrosatelitů se dvěma až osmi alelami na lokus. Celkem 4 z těchto 20 polymorfních mikrosatelitů jsem našla polymorfní i u pelikána afrického.

Na 6 nepříbuzných jedincích nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) testovala tyto mikrosatelity Nedvědová (2015). Celkem u tohoto zástupce řádu brodivých ptáků našla autorka 46 polymorfních mikrosatelitů se dvěma až pěti alelami na lokus. Z těchto 46 polymorfních mikrosatelitů jsem jich našla 8, které byly polymorfní i u pelikána afrického.

Dále tyto mikrosatelity testovala na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) z řádu plameňáci Strejčková (2016). K testování bylo použito všech 213 mikrosatelitů a byla opět použita metoda *cross-species* PCR amplifikace. Celkově autorka našla 50 polymorfních mikrosatelitů se dvěma až pěti alelami na lokus. Pro těchto 50 mikrosatelitů, které označila jako polymorfní ve své bakalářské práci, se snažila zjistit jejich charakteristiky z genotypů 30 jedinců pelikána karibského. Na základě toho Strejčková (2018) zjistila, že 5 mikrosatelitů označila mylně jako polymorfní a ty vyřadila. Celkem tedy ve své diplomové práci charakterizovala 45 polymorfních mikrosatelitů se 2–11 alelami na lokus. Z těchto 45 lokusů jsem jich 12 označila za polymorfní u pelikána afrického.

Na příbuzném druhu plameňáka prováděla testování Kůrová (2017), tentokrát byl k testování použit plameňák růžový (*P. roseus*). Metodou *cross-species* PCR amplifikace

autorka našla 49 polymorfních mikrosatelitů, opět se dvěma až pěti alelami na lokus. Já jsem u pelikána afrického našla celkem 11 polymorfních mikrosatelitů z těchto 49, které autorka označila jako polymorfní u plameňáka růžového.

Verešová (2018) prováděla testování všech 213 mikrosatelitů metodou *cross-species* PCR amplifikace u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) z řádu veslonozí, našla pouze 12 polymorfních mikrosatelitů s počtem alel 2–3. V rámci testování těchto 12 polymorfních mikrosatelitů jsem našla 3, které rovněž vykazovaly polymorfismus u pelikána afrického.

Nejvyšší úspěšnost nalezení polymorfního lokusu u těchto 213 mikrosatelitů, izolovaných od ptáků z řádu trubkonosí, dlohokřídlí a pěvci, měla Strejčková (2016) u plameňáka karibského a to 23,5 %. Při opětovném testování na 30 jedincích plameňáka karibského Strejčková (2018) potvrdila 45 polymorfních mikrosatelitů (z původních 50) a úspěšnost nalezení polymorfního lokusu byla tedy 21,2 %. Naopak nejmenší úspěšnost měla Verešová (2018), kdy výsledná úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitu byla 5,6 %.

V následující tabulce č. 6 je uveden přehled všech polymorfních mikrosatelitů, které jsem našla ve své práci. Je zde uvedeno srovnání polymorfních mikrosatelitů u pelikána afrického a dalších 5 druhů z kladu Aequirornithes, které ke své práci použily Janušová (2015), Nedvědová (2015), Kůrová (2017), Strejčková (2018) a Verešová (2018). U všech 6 druhů uvedených v tabulce byla provedena *cross-species* PCR amplifikace 213 mikrosatelitů z nichž 207 pocházelo od ptáků z řádu trubkonosí a dalších 6, které byly polymorfní u trubkonosích pocházelo z řádů dlouhokřídlí a pěvci. Ani jeden z uvedených mikrosatelitů nevykazoval polymorfismus u všech 6 testovaných druhů. Za nejúspěšnější lze považovat mikrosatelity Omn8 od buňáčka Monteirova a Paequ3 od buňáka bělobradého, které byly polymorfní u 5 ze 6 testovaných druhů. Dále byly úspěšné mikrosatelity LAAL7 od albatrosa laysanského a Pc B109 od buňáka světlonohého, které byly polymorfní u 4 ze 6 testovaných druhů. Celkem 6 mikrosatelitů, které jsem zjistila jako polymorfní u pelikána afrického, nevykazovalo polymorfismus ani u jednoho z dalších srovnávaných druhů.

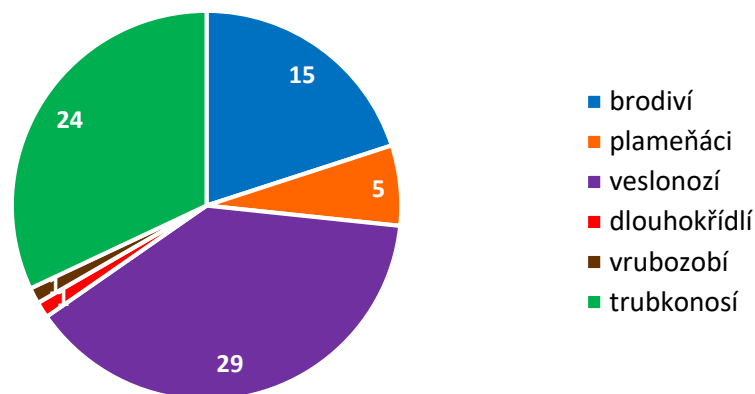
Tabulka č. 6: Seznam polymorfních mikrosatelitů u pelikána afrického, izolovaných od zástupců řádu trubkonosí, v porovnání s dalšími 5 druhy z kladu Aequorlornithes, u nichž byly tyto mikrosatelity také testovány. Číslem je značen počet nalezených alel, písmenem M pak monomorfní lokusy. Data pro testování byla získána vždy od 6 nepříbuzných jedinců s výjimkou pelikána karibského, kdy bylo k testování použito 30 jedinců.

Lokus	Testovaný druh					
	pelikán africký	pelikán kadeřavý	plameňák karibský	plameňák růžový	potápka roháč	nesyt indomalajský
De17	2	M	M	M	M	M
Dc9	2	M	M	M	M	M
STAL18	2	M	M	M	M	2
BFAL4	2	2	2	M	M	2
LAAL7	2	2	6	3	M	M
Ole21	2	M	M	2	M	M
Ole22	2	M	M	M	M	M
Ole26	2	M	M	M	M	3
Omn2	2	M	M	M	M	2
Omn8	3	M	7	5	6	4
Omn23	2	M	M	M	M	M
Paequ2	3	M	M	M	M	M
Paequ3	3	2	3	4	M	2
Paequ8	2	M	3	M	M	4
Cd3	2	M	M	M	M	M
Cd5	2	M	2	2	M	M
Pc A107	2	M	2	M	2	M
Pc B109	2	M	4	2	5	M
Bb25	2	M	3	3	M	M
Patbel2	2	M	M	M	5	5
Patbel3	3	M	M	2	M	M
Pacbel 00386	2	M	5	3	M	M
Pacbel 08988	2	M	3	3	M	M
Pacbel 10033	2	M	2	2	M	M

Dosud bylo u pelikána afrického v Laboratoři populační genetiky KBB Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci otestováno celkem 601 párů primerů (388 v předchozích bakalářských a diplomových pracích, 213 v této práci).

V bakalářských (Dvořáková, 2010; Chmelařová, 2010) a diplomových pracích (Ranochová, 2008; Mikulová, 2010, Chmelařová, 2012) byly u pelikána afrického testovány mikrosatelity z 8 různých řádů ptáků. K testování autorky použily všechny v té době známé primery pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitů od veslonohých (Pelecaniformes), potápek (Podicipediformes), potáplic (Gaviiformes), plameňáků (Phoenicopteriformes) a brodivých (Ciconiiformes) a dále několik málo od dlouhokřídlých (Charadriiformes), tučňáků (Sphenisciformes) a vrubozobých (Anseriformes). Ze všech těchto mikrosatelitů jich bylo celkem 51 polymorfních. Od řádů potápky a potáplice nebyl u pelikána afrického nalezen žádný polymorfní mikrosatelit. V této bakalářské práci jsem testovala mikrosatelity od ptáků z řádu trubkonosí a několik málo z řádu dlouhokřídlí a pěvci a celkem jsem našla 24 polymorfních. Doposud tedy bylo nalezeno 75 polymorfních mikrosatelitů pro pelikána afrického. Jejich rozdělení podle řádu v tradičním pojetí systému podle Gaisler *et* Zima (2007) uvádím v grafu č. 2.

Graf č. 2: Rozdělení 75 polymorfních mikrosatelitů, které byly nalezeny u pelikána afrického. Mikrosatelity jsou rozděleny podle řádů v tradičním pojetí systému ptáků podle Gaisler *et* Zima (2007).



Pro získání více polymorfních mikrosatelitních lokusů by bylo dobré otestovat další nově objevené primery ze zmíněných řádů kladu Aequorlitorornithes. A dále ze skupin kladu Aequorlitorornithes, které ještě nebyly testovány, a to dlouhokřídlí a slunatci.

Dále by bylo vhodné s polymorfními mikrosatelity pro pelikána afrického, které jsem popsala v této práci, provést analýzu genotypů u většího počtu nepříbuzných jedinců, aby bylo možné získat jejich podrobné charakteristiky a vybrat z nich ty, které by v budoucnu byly vhodné pro populační a paternitní analýzy.

8. Závěr

V této bakalářské práci jsem pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace otestovala na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) celkem 213 párů primerů, které byly původně navrženy pro PCR amplifikaci polymorfních mikrosatelitních lokusů pro zástupce řádu trubkonosí (Procellariiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes) a pěvci (Passeriformes). Celkem 207 párů primerů bylo navrženo pro ptáky z řádu trubkonosí, konkrétně 53 pro zástupce čeledi albatrosovití (Diomedidae), 54 pro zástupce čeledi buňáčkovití (Hydrobatidae) a 100 pro zástupce čeledi buňákovití (Procellariidae). Pro zástupce z čeledi buňíkovití (Pelecanoididae) nebyl zatím popsán žádný mikrosatelitní lokus. Dále bylo 5 mikrosatelitních lokusů odvozených od zástupců dlouhokřídlych, konkrétně od čeledi alkovití (Alcidae), rackovití (Laridae) a kulíkovití (Charadriidae). Jeden mikrosatelit byl odvozen od zástupce z čeledi lesňáčkovití (Parulidae) patřící do řádu pěvci.

Nalezla jsem celkem 24 polymorfních mikrosatelitních lokusů z 213 testovaných. U všech 24 polymorfních mikrosatelitů byly detekovány 2–3 alely na lokus. Celkem jsem našla 5 polymorfních mikrosatelitů, které byly původně navrženy pro zástupce čeledi albatrosovití, 6 polymorfních mikrosatelitů pocházelo od druhů z čeledi buňáčkovití a 13 od druhů z čeledi buňákovití. Od řádů dlouhokřídli a pěvci nebyl u pelikána afrického nalezen žádný polymorfní lokus.

Úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitu činila 11,3 %. Co se týče úspěšnosti nalezení polymorfního lokusu od jednotlivých čeledí, pro čeleď albatrosovití byla zjištěna nejnižší úspěšnost nalezení polymorfního lokusu, pouze 9,4 %. Od čeledi buňáčkovití byla úspěšnost trochu vyšší, celkem 11,1 % a od čeledi buňákovití byla úspěšnost stanovení polymorfního lokusu nejvyšší a to 13 %.

9. Použitá literatura

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

Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuskript, publikované online na <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>, navštíveno dne 22. 6. 2018

Baker, A. J. (2000), Molecular methods in ecology. MA: Blackwell Science, Malden. ISBN 978-0-632-03437-6.

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 storm-petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). Conservation Genetics Resources, 3, 711–716.

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.

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, 9, 913–915.

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 grey-

headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. *Molecular Ecology*, 10, 2647–2660.

Burg, T. M., Croxall, J. P. (2004): Global population structure and taxonomy of the wandering albatross species complex. *Molecular Ecology*, 13, 2345–2355.

Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*, 79, 506–514.

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

del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.

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

Dvořáková B. (2010): Analýza polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Friesen, V. L., González, J. A., Cruz-Delgado, F. (2006): Population genetic structure and conservation of the Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Conservation Genetics*, 7, 105–115.

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

Given, A. D., Mills, J. A., Baker, A. J. (2002): Isolation of polymorphic microsatellite loci from the red-billed gull (*Larus novaehollandiae scopulinus*) and amplification in related species. *Molecular Ecology Notes*, 2, 416–418.

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 shearwater, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1044–1046.

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

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 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.

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

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

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

Janušová, D. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Jarne, P., Lagoda P., J., (1996), Microsatellites, from Molecules to Populations and Back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 424–429.

Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y. W., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A., Weber, C. C., da Fonseca, R. R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J.,

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

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

Küpper, C., Horburgh, G. J., Dawson, D. A., French-Constant, R., Szekely, T., Burke, T. (2007): Characterization of 36 polymorphic microsatellite loci in the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) including two sex-linked loci and their amplification in four other *Charadrius* species. *Molecular Ecology Notes*, 7, 35–39.

Kůrová, V. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Lawrence, H. A. (2008): *Conservation Genetics of the World's Most Endangered Seabird, the Chatham Island Tāiko*. Dissertation. Auckland, Nový Zéland, Massey University, publikováno online na: <http://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>, navštíveno dne 17. 6. 2018.

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 heterologous 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.
- 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.
- Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Møller, A. P., Ellegren, H. (1997): Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research*, 7, 471–482.
- 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.
- 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.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer 3 on the WWW for general users and for biologists programmers. In: Miesner, S., Krawetz, S. A. (eds.): *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Human Press Inc., Totowa, 365–386.
- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365–371.
- Smith, N. D. (2010): *Phylogenetic Analysis of Pelecaniformes (Aves) Based on Osteological Data: Implications for Waterbird Phylogeny and Fossil Calibration Studies*.

PLoS ONE, 5, e13354.

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.

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.

Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463–6471

Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004): Characterization of microsatellite loci in White-chinned 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. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., de Freitas Munhoz, C. (2016). Microsatellite Markers: What They Mean 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.

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