

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Barbora Macková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu
trubkonosí u pelikána skvrnozobého
(*Pelecanus philippensis*)**

Bakalářská práce

Barbora Macková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora MACKOVÁ**
Osobní číslo: **R180164**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*).**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování řešerše na téma bakalářské práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA pelikána skvrnozobého s využitím cross-species primerů pro mikrosatelity, které jsou známé u ptáků z řádu trubkonosí.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- 1) Prum, R.O. et al. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569-573.
- 2) Moodley, Y. et al. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046-1058.
- 3) Kennedy, M. et al. (2013): The phylogenetic relationships of the extant pelicans inferred from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 215-222.
- 4) Bicknell, A.W.J. et al. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's storm-petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). *Conservation Genetics Resources*, 3, 711-716.
- 5) Briedl, J. et al. (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.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 13. července 2020

Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901
-2-

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

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

V Olomouci dne 28. 7. 2021

Chtěla bych poděkovat panu RNDr. Petru Nádvořníkovi, Ph.D. za trpělivost a čas, který mi věnoval při zpracování teoretické i experimentální části mé bakalářské práce, za jeho odborné vedení a poskytnuté materiály.

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Barbora Macková
Název práce	<i>Cross-species</i> amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána skvrnozobého (<i>Pelecanus philippensis</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
Rok obhajoby	2021

Abstrakt

Náplní této bakalářské práce bylo nalezení polymorfních mikrosatelitních lokusů u pelikána skvrnozobého pomocí *cross-species* PCR amplifikace.

V teoretické části jsem se věnovala zařazení pelikána skvrnozobého do systému, popisu řádu pelikáni, rodu pelikán a pelikána skvrnozobého. Dále je zde uvedena obecná charakteristika mikrosatelitů a jejich dělení.

V praktické části jsem používala metodu *cross-species* PCR amplifikace pro testování polymorfismu mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého s využitím 213 párů primerů. 207 párů primerů bylo navrženo pro zástupce z řádu trubkonosí. 5 párů primerů od zástupců řádu dlouhokřídli a 1 od zástupce řádu pěvci poskytly u zástupců z řádu trubkonosí polymorfní produkt, proto byly také využity pro testování. Z těchto mikrosatelitů jich 22 poskytlo polymorfní produkt, 189 monomorfní produkt a dva páry primerů produkt neposkytly.

Klíčová slova	pelikán skvrnozobý, <i>Pelecanus philippensis</i> , trubkonosí Procellariiformes, mikrosatelit, PCR amplifikace
Počet stran	54
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Barbora Macková
Title	Cross-species amplification of microsatellites from Procellariiformes in Spot-billed Pelican (<i>Pelecanus philippensis</i>)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

The aim of this bachelor's thesis was to find polymorphic microsatellite loci of the spot-billed pelican by employing the cross-species PCR amplification.

The theoretical part of my thesis was focused on scientific classification of the spot-billed pelican, the description of the family Pelecanidae, the genus *Pelecanus* and the species *P. philippensis*. It also included a general characteristic and typecasting of microsatellites.

In the practical part, I have applied the cross-species PCR amplification method to test the polymorphism of microsatellite loci of six unrelated individuals of the spot-billed pelican, using 213 primer pairs. 207 primer pairs were designed from members of Procellariiformes. 5 primer pairs from members of Charadriiformes and 1 primer pair from a member of Passeriformes have provided the polymorphic product for Procellariiformes species, hence the utilisation of these for testing. Of these microsatellites, 22 have provided the polymorphic product, 189 provided the monomorphic product, and two primer pairs have provided none.

Keywords	Spot-billed Pelican, <i>Pelecanus philippensis</i> , Procellariiformes, microsatellites, PCR amplification
Number of pages	54
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Zařazení pelikánů do systému.....	3
3.2	Řád Pelecaniformes	4
3.2.1	Rod pelikán.....	5
3.3	Mikrosatelity	8
3.3.1	Mikrosatelity od druhů z řádu trubkonosí	9
4	Materiál a metody	15
4.1	Biologický materiál.....	15
4.2	Použité chemikálie.....	15
4.3	Použité roztoky	16
4.4	Laboratorní přístroje	17
4.5	PCR amplifikace DNA pelikána skvrnozobého	18
4.6	Zpracování PCR produktů elektroforetickou separací.....	22
5	Výsledky	24
6	Diskuze	30
7	Závěr	38
8	Použitá literatura	39

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Systém Aequorlitornithes (Prum <i>et al.</i> , 2015).....	4
Obrázek č. 2: Graf 22 mikrosatelitů polymorfních u pelikána skvrnozobého rozdělených podle druhů, ze kterých byly izolovány.	27
Obrázek č. 3: Elektroforetogram mikrosatelitu Cd1 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.	29
Obrázek č. 4: Elektroforetogram mikrosatelitu Oc28B testovaného u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.	29
Obrázek č. 5: Elektroforetogram mikrosatelitu STAL18 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.....	29
Obrázek č. 6: Elektroforetogram mikrosatelitu Patbel2 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.	30

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Složení PCR směsi pro šest vzorků.	18
Tabulka č. 2: Mikrosatelity izolované z řádu trubkonosí, které byly testovány na polymorfismus u pelikána skvrnozobého.	19
Tabulka č. 3: Mikrosatelity izolované z řádu dlouhokřídlí a pěvci, které byly testovány na polymorfismus u pelikána skvrnozobého.	21
Tabulka č. 4: Dvacet dva polymorfních lokusů, které byly amplifikovány u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. V tabulce je uveden název lokusu s kódem z databáze GenBank, zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repeticity, počet alel (N), teplota <i>annealingu</i> (T_A) a doba trvání elektroforetické separace (ELFO).	25
Tabulka č. 5: Genotypy 22 polymorfních mikrosatelitních lokusů získaných při cross-species PCR amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. V tabulce je uveden název mikrosatelitního lokusu, zdrojový druh, počet alel a genotyp.	28
Tabulka č. 6: Souhrn polymorfních mikrosatelitů testovaných v této práci na pelikánu skvrnozobém, které byly zároveň polymorfní u nesyta indomalajského (Nedvědová, 2015), plameňáka karibského (Strejčková, 2018), růžového (Zlochová, 2019), pelikána afrického (Kopečná, 2020), bílého (Huzieczková, 2019) a potápky roháče (Janušová, 2017). V tabulce je uveden počet nalezených alel, M = monomorfní lokus. Čísla u jednotlivých druhů značí počet testovaných jedinců.	36

1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké repetitivní sekvence, vyskytující se v eukaryotických i prokaryotických genomech. Jsou složeny z krátkých opakování několika málo párů bází. Mikrosatelity jsou vysoce variabilní, kodominantní, mají vysoký alelový polymorfismus. Jsou často používanými markery v molekulární biologii. Využívají se při paternitních studiích, k testování fylogenetické příbuznosti organismů nebo při genetickém mapování.

V této bakalářské práci budu pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace testovat mikrosatelitní lokusy u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. K testování budu používat 213 párů primerů, které poskytly polymorfní produkt u řádu trubkonosí. 207 bylo navrženo přímo pro zástupce z řádu trubkonosí, 5 bylo u trubkonosích použito jako *cross-species* od zástupců z řádu dlouhokřídlí a 1 od zástupce řádu pěvci.

2 Cíle práce

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

3 Literární přehled

3.1 Zařazení pelikánů do systému

Řád veslonozí je tradičně označován za monofyletický s 6 čeleděmi: fregatkovití (Fregatidae), faetonovití (Phaethontidae), pelikánovití (Pelecanidae), anhingovití (Anhingidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae) a terejovití (Sulidae). Monofylie skupiny byla přijímána díky znakům, které se vyskytují u těchto druhů ptáků. Všichni zástupci mají čtyři prsty, roztažitelný krční vak a o mláďata se starají oba rodiče (Hedges *et Sibley*, 1994; Gibb *et al.*, 2013).

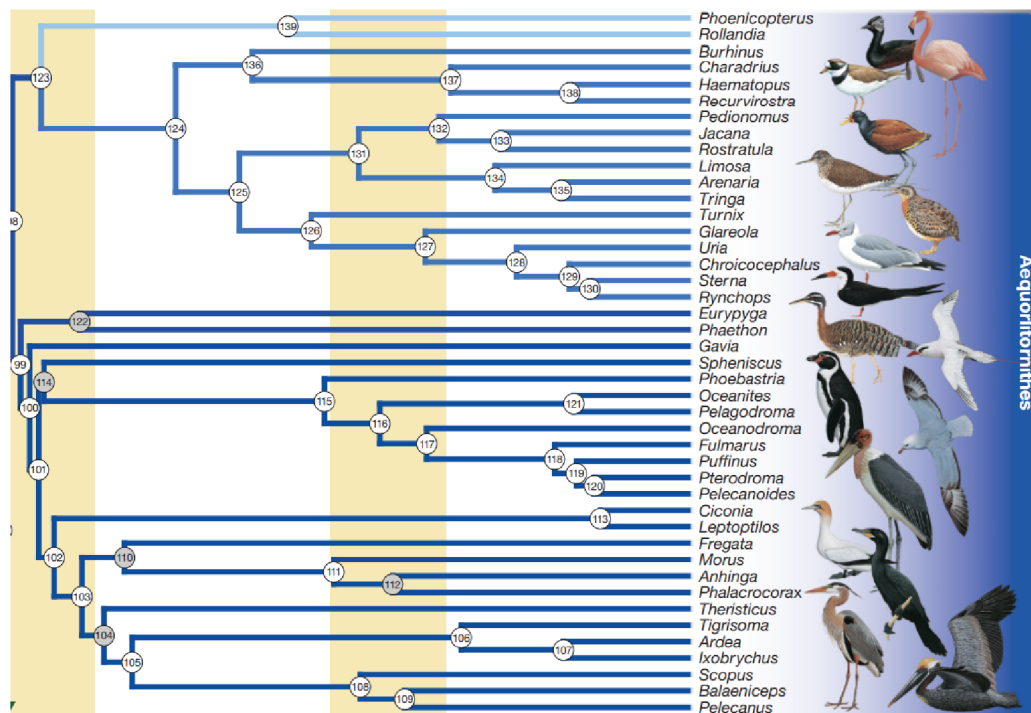
Monofylie skupiny byla popřena studií, kterou provedli Hedges *et Sibley* (1994). Podle DNA-DNA hybridizace 16 ptačích taxonů jsou pelikáni příbuzní s člunozubcem africkým (*Balaeniceps rex*) a vyvrátili tak předpoklad, že pelikáni jsou si blízcí s kormorány a tereji. DNA-DNA hybridizace dále ukázala na úzké spojení mezi čeleděmi terejovitých, kormoránovitých a anhingovitých. Podle autorů fregatky evolučně nepatří do veslonohých, ale zařazují se do Suliformes. Podle studie má tato čeleď blíže k tučňákům, buňňákům a albatrosům (Hedges *et Sibley*, 1994).

Výsledky studie jaderné a mitochondriální DNA a DNA-DNA hybridizace u 19 druhů ptáků ukazují, že veslovací noha se vyvinula více než jednou a změny u vodních ptáků postupovaly rychleji, než se dříve předpokládalo. Molekulární data ukázala příbuznost kladivouše afrického (*Scopus umbretta*) a člunozubce afrického s pelikány (Tuinen *et al.*, 2001).

Hackett *et al.* (2008) se zabývali údaji od 169 druhů ptáků, kdy na základě molekulárních a morfologických dat ptáky rozdělili do dvou linií. První z nich dále rozdělují na další dvě skupiny - Paleognathae, kam se zařazují běžci, a Neognathae, kteří jsou dále členěni na Galloanserae a Neoaves. Jejich studie podpořila výsledky Tuinena *et al.* (2001), kteří uvedli kladivouše a člunozobce jako sesterské rody k rodu pelikán. Čeleď Phaethontidae byla z veslonohých zcela vyloučena (Hackett *et al.*, 2008).

Fylogenetickou analýzu 48 druhů ptáků provedli Jarvis *et al.* (2014), díky ní rozdělili Neoaves na dvě sesterské linie: Passera a Columbea. Z těchto linií byly vyčleněny skupiny ptáků vodních (Aequornithia) a suchozemských (Telluraves). Do kladu vodních ptáků autoři zařadili pelikány, volavky, ibise, kormorány, buňňáky, tučňáky a potáplice. Do sesterské skupiny tohoto kladu byli zahrnuti faetoni a slunatci (Jarvis *et al.*, 2014).

Rozšířenější studii provedli Prum *et al.* (2015), kteří studovali genomickou DNA 198 druhů ptáků ze 122 čeledí. Autoři přišli z koncepcí skupiny vodních ptáků Aequorlitorornithes, která je na obrázku č. 1, kam patří všichni vodní ptáci s výjimkou vrubozobých (Anseriformes). V rámci této skupiny jsou plameňáci a potápky sesterskou skupinou bahňáků. Člunozubec, kladivouš a pelikán tvoří sesterskou větev k druhům z čeledi volavkovití (Prum *et al.*, 2015).



Obrázek č. 1: Systém Aequorlitorornithes (Prum *et al.*, 2015).

Řád veslonozí byl dříve brán jako monofyletický taxon, nově jsou označováni za parafyletický taxon, a to i přes některé společné znaky. Africké druhy člunozobec a kladivouš, čeledě volavkovití a ibisovití, kteří byli dříve řazeni do brodivých, se podle molekulárních studií stali fylogeneticky nejbližší pelikánům. Po rozsáhlých fylogenetických úpravách zůstala v řádu Pelecaniformes pouze čeleď pelikánovití, ke které přibyly 4 další čeledě: kladivoušovití, člunozobcovití, volavkovití a ibisovití (Gaisler *et Zima*, 2018).

3.2 Řád Pelecaniformes

V této práci se dále budu zabývat novým pojetím řádu Pelecaniformes. Mnoho druhů, patřících do tohoto řádu, se svým tělem podobá čápům, a to svými dlouhými nohama a protáhlými štíhlými krky, výjimku tvoří pelikáni. Ti se vyznačují krátkými nohama s plovacími blánami (Šťastný *et al.*, 2016). Další charakteristické znaky jsou silný jazyk, roztažitelný jícen, přítomnost kostrční žlázy, vnější nozdry jsou redukováné

a vomer chybí (Gaisler *et* Zima, 2018). Nejmenším druhem z řádu Pelecaniformes je bukáček malý (*Ixobrychus minutus*) o délce těla 26–36 cm, naopak největším ptákem z tohoto řádu je člunozubec africký, který dosahuje délky těla přibližně 120 cm. Druhy se mimo jiné odlišují i svými zobáky. Například volavky mají úzký, štíhlý a velmi špičatý zobák se zoubkovanými ostrými okraji. Naproti tomu štíhlý zobák zahnutý do oblouku mají ibisové, kteří jím hledají potravu ve vodě a měkké půdě. Pelikáni se od ostatních odlišují i technikou lovu, jelikož se díky obrovské pneumatizaci těla nedovedou potápět (Šťastný *et al.*, 2016). Živí se převážně rybami. Kolonie jednotlivých druhů ptáků obývají nejčastěji sladkovodní stanoviště tropů, subtropů až mírného pásu (Gaisler *et* Zima, 2018).

3.2.1 Rod pelikán

Rod pelikán zahrnuje 8 druhů a je jediným rodem čeledi pelikánovití (Hanzák, *et* Hudec, 1963). Pelikáni byli podle sekvence DNA z mitochondriálních i jaderných genů rozděleni do tří kladů. Do prvního kladu byl zařazen pelikán kadeřavý (*Pelecanus crispus*), skvrnozobý (*P. philippensis*) a africký (*P. rufescens*) vyskytující se na území Evropy, Afriky a Asie. Druhý klad zahrnuje druhy, vyskytující se na území západní polokoule, pelikána severoamerického (*P. erythrorhynchos*), hnědého (*P. occidentalis*) a chilského (*P. thagus*), kteří tvoří monofyletickou skupinu. Tyto čtyři druhy jsou zároveň sesterskou skupinou pelikána bílého (*P. onocrotalus*) tvořícího třetí klad. Nejstarší fosilie pelikána byla datována do doby před 30 miliony let (Kennedy *et al.*, 2013).

Pelikáni jsou velcí, těžcí, na souši neohrabaní ptáci, naopak při lovu ryb jsou velice obratní (Hanzák *et* Hudec, 1963). Největší je pelikán kadeřavý, který dosahuje délky těla až 180 cm, s rozpětím křídel až 345 cm a maximální hmotností 13 kg. Pelikán hnědý je nejmenším druhem s rozpětím křídel až 203 cm a vážící kolem 4 kg (del Hoyo, 1992).

Pelikáni mají vzhledem k tělu krátké nohy posazené daleko od sebe. Mají čtyři prsty směřující dopředu spojené plovací blánou. Zobák mají dlouhý, na konci mírně zahnutý, je velice citlivý a dokáže v kalné vodě detekovat ryby. Široký a roztažitelný vak, který je připojený ke spodní čelisti, využívají v horkém počasí, kdy se díky němu ochlazují nebo ho používají ke sběru dešťové vody. Při letu pelikánů je možnost si všimnout, že zobák mají pelikáni položen na hrudi (Hanzák *et* Hudec, 1963, del Hoyo, 1992).

Dospělí pelikáni jsou obvykle bílí, jejich peří může mít šedivý nebo narůžovělý nádech. Výjimku tvoří jediný mořský pelikán, pelikán hnědý. Narůžovělá barva je způsobena sekrecí uropygiální žlázy. U pelikánů lze pozorovat pohlavní dimorfismus pouze v období rozmnožování, kdy v rámci některých druhů se pohlaví liší svým zbarvením. Například u samce pelikána bílého lze pozorovat bledě žlutou či narůžovělou kůži v oblasti obličeje, naopak samice mají v oblasti obličeje barvu tmavě oranžovou (del Hoyo, 1992).

Pelikáni jsou společenští ptáci. I při letu se shlukují ve větší hejna přibližně 30 jedinců. Při letu zaujímají formaci tzv. do V, někteří vědci se domnívají, že takové rozvržení může pomoci pelikánům s aerodynamikou. Forma letu vypadá tak, že ptáci udělají několik hlubokých úderů křídly a následně se delší dobu „klouzají“. Bez přistání dokáže pelikán létat až 24 hodin a urazit vzdálenost přibližně 500 km za den (del Hoyo, 1992).

Potrava pelikánů se skládá zejména z ryb. Pelikán severoamerický si vybírá druhy jako je kapr (*Cyprinus carpio*) nebo jelec (*Siphateles obesus*). U pelikána hnědého tvoří 90–95 % potravy ryby rodu menhaden (*Brevoortia*).

Rozmnožovací období u pelikánů začíná obvykle v listopadu a končí v dubnu. V listopadu začínají námluvy, které nejsou tak atraktivní jako u jiných skupin ptáků. Po námluvách vytvářejí páry a začínají stavět hnízda (Anonymous, 2017). Místa k hnízdění pelikánů jsou různá, hnízdí v rákosí, v křovinách i na volném prostranství (Hanzák *et* Hudec, 1963). Místo hnízda je u většiny druhů vybíráno samicí (del Hoyo, 1992). Samice do hnízda klade ve dvoudenním intervalu 1 až 6 modrobílých vajec. Inkubace trvá 30–36 dní, kdy se rodiče v zahřívání střídají po jednom dnu. Mláďata se líhnou asi 24 hodin, téměř holá a jejich zobák není ve srovnání s tělem nijak veliký, ten jim začne mohutnět, až když začne růst prachové peří. Rodiče mláďata krmí natrávenými rybami, ta je vybírají z hrdelního vaku. Do zobáku často zasunují i svoji hlavu, aby se k potravě dostala (Hanzák *et* Hudec, 1963; del Hoyo, 1992). U druhů hnízdících na stromech, dospělí postupně přestávají mláďata krmit, to nutí mláďata opustit hnízdo a postupně se osamostatňovat. Mláďata se po 70–80 dnech stávají samostatnými a připojují se k rodičům na lov ryb. Po třech až pěti letech pelikáni dosáhnou pohlavní dospělosti. Ve volné přírodě se pelikáni dožívají 15–25 let, zatímco v zajetí až 54 let.

3.2.1.1 Pelikán skvrnozobý

Systematické zařazení pelikána skvrnozobého do systému je podle klasifikace Gaisler *et* Zima (2018) následující:

Říše: živočichové (Animalia)

Kmen: strunatci (Chordata)

Podkmen: obratlovci (Vertebrata)

Třída: ptáci (Aves)

Řád: pelikáni (Pelecaniformes)

Čeleď: pelikánovití (Pelecanidae)

Rod: pelikán (*Pelecanus*)

Druh: pelikán skvrnozobý (*Pelecanus philippensis*)

Délka těla pelikána skvrnozobého od prstů ke špičce zobáku je 127–152 cm, váží přibližně 5 kg a jeho zobák je dlouhý 285–355 mm. Samice jsou menší než samci. Nohy mají krátké, tmavě hnědé barvy. Peří je zabarvené šedou nebo hnědou barvou (del Hoyo, 1992).

Tento druh se nachází v blízkosti vodních ploch. Hnízdo si vytváří na velkých stromech, obvykle v bažinatém lese nebo bažinaté savaně. Potravou jsou pro něho převážně ryby, denní potřeba se odhaduje na přibližně 1 kg. Lov ryb probíhá v hejnech v mělkých vodách (del Hoyo, 1992).

Období rozmnožování u pelikána skvrnozobého začíná v září a končí v květnu. V tomto období se u samce zbarví kůže kolem očí na žluto. Namlouvání samic neprobíhá tak aktivně, jako u jiných skupin ptáků. Samec si samicí namlouvá pouze na vrcholu stromu, nikoli v letu či ve vodě. Po nalezení partnerky si začíná stavět hnízdo na stromě (Gokula, 2011). Na jednom stromě se vyskytuje 3–15 hnízd. Hnízda nemusejí být primárně jen pelikánů, na stejném stromě si mohou stavět hnízda čápi, volavky či kormoráni (del Hoyo, 1992).

Jedná se o druh klasifikovaný jako téměř ohrožený. Populace tohoto druhu klesá zejména díky pytláctví, lovu, ničení mokřadů, ale především z důvodu kácení hnízdních stromů, a to hlavně akácií. Pelikán skvrnozobý byl dříve běžným druhem v Asii, jeho početnost se však v minulosti snížila. Nyní se zde díky větším znalostem o ochraně tohoto druhu snaží o nárůst počtu jedinců. Jediné známé populace jsou jen na území Srí Lanky, Indie a Kambodže. Celosvětová populace druhu je odhadována na 8 700–12 000 pelikánů (Anonymous, 2017).

3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou krátké repetitivní sekvence vyskytující se v eukaryotických i prokaryotických genomech (Tautz, 1989). Jsou složeny z krátkých opakování, která se nacházejí bezprostředně za sebou, o délce od jedné do pěti párů bází (bp). V genomu se mnohé mikrosatelity vyskytují ve více variantách (alelách), které se liší různým počtem repetice, tedy různou délkou (Bennet, 2000). Lze je nalézt v kódujících i v nekódujících oblastech genomu (Tóth *et al.*, 2000). Mikrosatelity často podléhají mutacím, například insercím a delecím celých jednotek repetice. K insercím a delecím nejčastěji dochází díky posunu v opakujících se sekvencích chybou DNA polymerázy (Sia *et al.*, 1997). Vzhledem k vysoké míře mutací se předpokládá, že mikrosatelity hrají důležitou roli v evoluci genomu (Tóth *et al.*, 2000). Rychlost mutací mikrosatelitů je mnohem vyšší než u jiných částí genomu (10^{-2} – 10^{-6} nukleotidů na lokus za generaci) (Oliveira *et al.*, 2006).

Jako nevýhoda se u mikrosatelitů ukazuje jejich nutná izolace *de novo* v případě nově studovaného druhu. Navrhování univerzálních primerů je problematické z důvodu výskytu mikrosatelitů v nekódujících oblastech, ve kterých se vyskytuje větší míra substituce nukleotidů (Kocher *et al.*, 1989).

Tóth *et al.* (2000) rozdělují mikrosatelity na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidy, zjistili, že výskyt poly(A/T) sekvence je v genomu častější než sekvence (C/G). Podle Oliveira *et al.* (2006) se mikrosatelity dělí podle uspořádání repetice jako dokonalé, nedokonalé, přerušované nebo složené. V případě dokonalého mikrosatelitu není opakovaná sekvence přerušena žádným párem bází, který není součástí motivu, oproti tomu v nedokonalém mikrosatelitu existuje pár bází mezi opakovanými motivy, který neodpovídá sekvenci motivu. V přerušovaném mikrosatelitu jsou pravidelně se opakující repetitivní sekvence přerušeny několika nukleotidy, které neodpovídají repetitivní sekvenci ani počtem či vzorem. Složený mikrosatelit obsahuje dvě sousedící různé tandemové repetice.

Nerovnoměrnou rekombinací a sklouznutím DNA (*DNA slippage*) z templátového řetězce během replikace nejčastěji dochází k inserci či delecii celých repetitivních motivů. Takovými mutacemi v sekvencích mikrosatelitů je způsoben polymorfismus mikrosatelitů (Bennet, 2000, Oliveira *et al.*, 2006). Mikrosatelitní lokusy se u ptáků vyskytují v menším počtu v genomu na rozdíl od savců nebo ryb (Dawson *et al.*, 2010).

3.3.1 Mikrosatelity od druhů z řádu trubkonosí

Řád trubkonosí (Procellariiformes) se dělí na čtyři čeledě - albatrosovití (Diomedidae), buňňákovití (Procellariidae), buňňáčkovití (Hydrobatidae) a buňňíkovití (Pelecanoididae). 207 mikrosatelitů pro čeledě albatrosovití, buňňákovití a buňňáčkovití je k dispozici v Laboratoři populační genetiky katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Dále 6 mikrosatelitů, které byly použity při studiu trubkonosých, ale už u nich byly použity jako *cross-species*, pocházejí z řádů dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pěvci (Passeriformes). Pět z nich pochází od zástupců z řádu dlouhokřídlí od čeledí alkovití (Alcidae), kulíkovití (Charadriidae) a rackovití (Laridae), jeden mikrosatelit pochází z řádu pěvci z čeledi lesňáčkovití (Parulidae).

3.3.1.1 Mikrosatelity od druhů z čeledi albatrosovití

Burg (1999) charakterizovala 26 polymorfních lokusů izolovaných ze dvou druhů albatrosa: šedohlavého (*Diomedea chrysostoma*) a stěhovavého (*D. exulans*). Pomocí 31 párů primerů byl získán PCR produkt v 26 případech. Dále byla provedena *cross-species* PCR amplifikace s použitím DNA z 50 jedinců albatrosa šedohlavého, 50 jedinců albatrosa černobrvého a 90 jedinců albatrosa stěhovavého. Úroveň polymorfismu se pohybovala od 2 do 11 alel. U albatrosa stěhovavého bylo nalezeno 15 polymorfních lokusů a u albatrosa šedohlavého 16.

Strukturu populace albatrosa šedohlavého a černobrvého (*Thalassarche melanophris*) pomocí mitochondriální DNA a mikrosatelitů analyzovali Burg *et* Croxall (2001). Izolace genomické DNA byla provedena pomocí Chelexu z odebraných vzorků krve. Autoři v experimentu použili 6 polymorfních lokusů, které byly již dříve popsány podle Burg (1999) a nově popsány De35. Těchto sedm mikrosateltních lokusů obsahovalo 4–13 alel pro albatrosa černobrvého a 5–22 alel pro albatrosa šedohlavého. Pro lokus De35 bylo u 660 jedinců albatrosa černobrvého nalezeno 12 alel a u 699 jedinců albatrosa šedohlavého 22 alel.

Strukturou populace vybraných druhů albatrosů se zabývali Burg *et* Croxall (2004). Krevní vzorky byly získány z dospělých albatrosů stěhovavých a z dalších dvou druhů albatrosů (*Diomedea antipodensis* a *D. gibsoni*), z nichž byla použitím Chelexu vyizolována genomická DNA. Autoři použili mikrosateltní lokusy izolované již dříve - De3, Dc5, De11, Dc16, De18, Dc20, Dc27, De33 (Burg, 1999) a jeden nově popsány

De37, který u všech druhů vykazoval polymorfismus s 6–7 alelami. Lokus De33 byl pro další analýzu vyloučen, jelikož se ukázal jako vázaný na pohlaví.

Dubois *et al.* (2005) popsali 10 polymorfních dinukleotidových mikrosatelitů u albatrosa stěhovavého. Celkově bylo vybráno 1248 klonů, 254 obsahovalo mikrosatelity a 132 z nich bylo vybráno jako vhodné pro sekvenování. Patnáct lokusů s největším počtem nepřerušovaných opakovaných úseků bylo použito pro další analýzu. Variabilita byla sledována u tří populací albatrosa, každá populace zahrnovala 20 jedinců. Polymorfismus vykazovalo 10 lokusů s 2–13 alelami.

Extrakci genomové DNA ze svalové tkáně 51 jedinců u tří druhů albatrosů - albatrosa čermonohého (*Phoebastria nigripes*), laysanského (*P. immutabilis*) a bělohřbetého (*P. albatrus*) a následnou charakterizaci 15 polymorfních mikrosatelitních lokusů provedli Hernandez *et al.* (2014). Variabilitu testovali u 36 jedinců albatrosa čermonohého, 12 jedinců albatrosa laysanského a 3 albatrosů bělohřbetých. Otestováním 16 párů primerů bylo detekováno 13 polymorfních lokusů s 2–18 alelami u albatrosa čermonohého, laysanského a 14 polymorfních lokusů s 2–7 alelami u albatrosa bělohřbetého.

3.3.1.2 Mikrosatelity od druhů z čeledi buňňáčkovití

Sun *et al.* (2009) popsali 10 mikrosatelitních lokusů u tří druhů - buňňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*), buňňáčka Monteirova (*O. monteiroi*) a buňňáčka dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*). Ze sedmi vzorků zmrazené krve buňňáčka madeirského a dvou vzorků zmrazené tkáně buňňáčka dlouhokřídlého byla vyizolovaná DNA, z které zkonstruovali genomickou knihovnu. Navrženými primery autoři testovali 27 jedinců buňňáčka madeirského, 22 jedinců buňňáčka Monteirova a 24 jedinců buňňáčka dlouhokřídlého. Polymorfismus byl zjištěn alespoň na šesti lokusech u každého druhu. Deset navržených mikrosatelitů bylo také testováno na buňňáčkoví galapážském (*O. tethys*), límčovém (*O. hornbyi*) a tmavohřbetém (*Pterodroma phaeopygia*). U těchto druhů byly téměř všechny PCR produkty amplifikované až na lokusy Oc64B a Oc79–2. Informace o polymorfismu autoři nevedli.

Bicknell *et al.* (2011) ve své práci charakterizovali 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů Ole1–Ole26 u buňňáčka dlouhokřídlého. Genomická DNA byla extrahována za použití metody srážení octanem amonným. Genomická knihovna byla sestavena z DNA pouze z jediného samce buňňáčka dlouhokřídlého. Z transformovaných kolonií autoři vyizolovali celkem 211 nových mikrosatelitních sekvencí, pro 50 z nich

byly navrženy páry primerů pomocí programu Primer3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000), které byly testovány na polymorfismus u 4–6 nepříbuzných jedinců. PCR v případě šesti lokusů neposkytla produkt, 18 lokusů bylo monomorfních a 26 lokusů bylo polymorfních. Na jedincích také testovali již 47 předtím popsaných párů primerů (Dawson, 2010). Dva lokusy produkt neamplifikovaly, 30 lokusů bylo monomorfních a polymorfní produkt poskytlo 15 lokusů. Celkem 41 polymorfních lokusů bylo testováno na 24 jedincích buňňáčka dlouhokřídlého (14 samců, 10 samic). Bylo nalezeno 2–22 alel na lokus.

Osmnáct mikrosatelitů popsali Bried *et al.* (2012) u buňňáčka Monteirova. Polymorfismus byl testován na 125 jedincích, z navržených 27 lokusů vykazovalo 18 lokusů polymorfismus se 4–17 alelami. Lokus Omn23 byl homozygotní u všech 65 testovaných samic, autoři předpokládají vazbu na chromozom Z. U buňňáčka madeirského, buňňáka modravého (*Halobaena caerulea*) a Bulwerova byla provedena *cross-species* PCR amplifikace těchto mikrosatelitů. U buňňáčka madeirského došlo k amplifikaci 17 lokusů s 2–6 alelami na lokus. U buňňáka Bulwerova byly detekovány 3 polymorfní lokusy se dvěma alelami a u buňňáka modravého dva polymorfní lokusy s 3 a 6 alelami.

3.3.1.3 Mikrosatelity od druhů z čeledi buňňákovití

Šest polymorfních dinukleotidových mikrosatelitních lokusů izolovali a charakterizovali Techow *et* O’Ryan (2004) u buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*). DNA byla extrahována pomocí fenol-chloroformové metody. Z 21 sekvenovaných rekombinantních plazmidů 17 obsahovalo mikrosatelity. Pro 10 mikrosatelitů byly navrženy primery, které autoři testovali u 68 jedinců buňňáka bělobradého. Polymorfismus vykazovalo 6 lokusů s 3–9 alelami. Tyto mikrosatelity byly také testovány u dalších šesti druhů: buňňáka Hallova (*Macronectes hallis*), obrovského (*M. giganteus*) a tristanského (*Procellaria conspicillata*), albatrosa černobrvého (*Thalassarche melanophris*), šedohlavého (*T. chrysostoma*) a stěhovavého (*Diomedea exulans*). Nejúspěšnější amplifikace proběhla u lokusu Paequ2, který poskytl produkt, ale polymorfismus tohoto lokusu byl zaznamenán pouze u buňňáka tristanského, albatrosa černobrvého, šedohlavého a stěhovavého. U pěti druhů byly lokusy Paequ3 a Paequ10 polymorfní, u albatrosa stěhovavého se je nepodařilo amplifikovat. Lokus Paequ4 byl polymorfní u 5 jedinců buňňáka obrovského a Hallova. U 5 jedinců buňňáka tristanského byl tento lokus monomorfní. Mikrosatelitní lokus Paequ7 byl polymorfní pouze u buňňáka tristanského a obrovského. U buňňáka tristanského a albatrosa šedohlavého autoři našli

polymorfní lokus Paequ8. Mikrosatelitní lokus Paequ13 se amplifikoval u buňňáka tristanského, albatrosa černobrvého a šedohlavého. U všech druhů byl tento lokus detekován polymorfní.

Jedenáct dinukleotidových mikrosatelitů popsali Bried *et al.* (2008) u populace buňňáka šedého (*Calonectris diomedea*) na Azorských ostrovech. Z celkového počtu 3036 klonů bylo 297 analyzováno pomocí sekvenátoru. Variabilita byla testována na 43 jedincích s použitím 15 lokusů s největším počtem nepřerušovaných opakovaných úseků, jedenáct z těchto lokusů vykazovalo 2–8 alel. Mikrosatelitní lokus Cd4 se u všech samic vyskytoval v homozygotní formě, jedná se nejspíše o lokus vázaný na chromozom Z. Byla provedena *cross-species* PCR amplifikace jedenácti mikrosatelitních lokusů Cd1–Cd11 u albatrosa stěhovavého, buňňáka bělobradého a buňňáka Bulwerova. Devět lokusů bylo detekováno jako polymorfních. Lokus Cd1 byl jediný polymorfní u albatrosa stěhovavého. U buňňáka bělobradého byly detekovány 2 polymorfní lokusy. Největší počet polymorfních lokusů byl u buňňáka Bulwerova, celkem 8 lokusů.

Dva polymorfní lokusy u buňňáka taiko (*Pterodroma magentae*) popsala Lawrence (2008). DNA byla izolována z odebrané krve 145 jedinců fenol-chloroformovou metodou. Ze 178 klonů, které byly osekvenovány, 99 z nich obsahovalo mikrosatelity. Pomocí programu Primer3 byly navrženy primery pro 9 oblastí s vhodnou sekvencí. Polymorfismus byl nalezen u lokusu Tch6, u kterého byly detekovány 2 alely. Následně byly navrženy primery pro 9 mikrosatelitních lokusů DNA. Z těchto lokusů se 6 amplifikovalo a jeden z těchto lokusů byl polymorfní, a to Tch25 se 4 alelami. Prostřednictvím PCR amplifikace bylo testováno dalších 22 již dříve navržených ptačích mikrosatelitů, z nich polymorfních bylo šest, konkrétně Paequ3, Paequ8, Paequ13, RBG18, RBG29 a De33.

Šest mikrosatelitních lokusů izolovali Brown *et* Jordan (2009) u buňňáka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*). Celková genomová DNA byla izolována ze vzorků tkání tří mrtvých mláďat pomocí fenol-chloroformové extrakce. Pozitivní klony byly testovány na přítomnost inzertu obsahujícího CA a CAGA repetic. Pro mikrosatelitní lokusy byly pomocí softwaru Primer3 navrženy primery. Ze 43 testovaných párů primerů pouze u šesti z nich došlo k tvorbě PCR produktu. Tři lokusy (Parm01–Parm03) byly polymorfní se 4–10 alelami, další tři lokusy (Parm04–Parm06) byly monomorfní. Autoři testovali tyto lokusy u 17 druhů z řádu trubkonosí a na jednom druhu tučňáka žlutorohého. Ukázalo se, že tyto mikrosatelitní lokusy jsou u těchto druhů polymorfní.

Dále byly testovány na buňňáku trinidadském již dříve známé mikrosatelitní lokusy původně navržené pro buňňáka bělobradého, kulíka mořského, albatrosa stěhovavého a šedohlavého. Šest mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních s 2–6 alelami, a to Paequ3, Paequ13 (Techov *et* O’Ryan, 2004), 10C5, 12H8 (Dubois *et al.*, 2005), De11 (Burg, 1999) a Calex-01 (Küpper *et al.*, 2007).

Deset mikrosatelitních lokusů izolovali a charakterizovali Gonzalez *et al.* (2009) u buňňáka baleárského (*Puffinus mauretanicus*). Genomová DNA byla získána ze svalové tkáně. Pomocí softwaru Primer3 byly navrženy primery pro 23 mikrosatelitů. Variabilita byla testována na 55 jedincích ze dvou různých lokalit Baleárských ostrovů. Autoři detekovali pouze deset lokusů jako polymorfních se dvěma až deseti alelami. Následně byla provedena *cross-species* PCR amplifikace těchto deseti mikrosatelitních lokusů u buňňáka středomořského, jako monomorfní byl detekován pouze lokus Puff G2F.

Andris *et al.* (2010) popsali jedenáct dinukleotidových mikrosatelitů u buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*). Variabilita byla zkoumána u 91 dospělých jedinců buňňáka Bulwerova. Z pětadvaceti se 24 ukázalo jako polymorfních, avšak pro další testování bylo použito pouze 11 lokusů kvůli problémům s amplifikací a nízkou četností heterozygotů u některých lokusů. Bylo detekováno 2–8 alel na lokus. Žádná z testovaných 44 samic nebyla heterozygotní na lokus u Bb11, což naznačuje vazbu tohoto mikrosatelitu na chromozom Z. Mezidruhová amplifikace těchto 11 lokusů byla testována na pěti jedincích buňňáka bělobradého, modravého a buňňáčka Monteinerova. Lokusy Bb11 a Bb22 byly detekovány jako polymorfní u všech tří druhů.

Deset mikrosatelitních lokusů izolovali Welch *et* Fleischer (2011) u buňňáka havajského (*Pterodroma sandwichensis*). Genomová DNA byla izolována ze vzorků tkáně jednoho samce a jedné samice. Z otestovaných 1400 klonů byly vybrány ty, které obsahovaly repetitivní oblast i obě hraniční oblasti, celkem 65. Primery byly navrženy pouze pro 54 klonů pomocí softwaru Primer3, jelikož 11 klonů obsahovalo pravděpodobně artefakt. Na 15 jedincích byly testovány tyto nově vytvořené primery a 37 párů primerů již dříve popsanych z řádu trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci (Dawson *et al.*, 1997, Burg, 1999, Given *et al.*, 2002, Techov *et* O’Ryan, 2004, Friesen *et al.*, 2006, Bried *et al.*, 2008, Gonzalez *et al.*, 2008, Brown *et* Jordan, 2009). Z *de novo* izolovaných mikrosatelitních lokusů bylo 10 polymorfních (Ptero01 až Ptero10) s 3–10 alelami na lokus. V případě *cross-species* PCR amplifikace u 10 polymorfních lokusů s 3–14 alelami.

Studiem mimopárové paternity u buňňáka útlozubého (*Pachyptila belcheri*) se zabývali Quillfeldt *et al.* (2012). Genomická DNA byla izolována ze vzorků peří od 25 dospělých jedinců a vzorků krve od 43 dospělých jedinců a 34 mlád'at. Sedm z testovaných párů primerů amplifikovalo produkt, který vykazoval polymorfismus. Patbel2 vykazoval nejvíce alel, a to 16, ostatních lokusy vykazovaly od 5 do 10 alel na lokus. Lokus Patbel5 se projevil u všech samic v homozygotní stavu, je zde tedy pravděpodobnost vazby na pohlaví, na chromozom Z.

Hardesty *et al.* (2013) charakterizovali jedenáct polymorfních lokusů u buňňáka světlonohého (*Puffinus carneipes*). DNA byla extrahována z krve a rozštěpena pomocí sedmi restrikčních enzymů (*RsaI*, *HaeIII*, *BsrB1*, *PvuII*, *StuI*, *ScaI* a *EcoRV*). Pro testování variability byla genomická DNA izolována z krve nebo peří ze 46 jedinců z hnízdních kolonií z Nového Jižního Walesu, 20 jedinců z Nového Zélandu, 5 jedinců ze západní Austrálie a 13 jedinců neznámého původu, kteří byli chyceni při rybolovu. Polymorfismus vykazovalo 11 lokusů s 3–13 alelami na lokus.

Dvacet pět polymorfních lokusů popsali Moodley *et al.* (2015) u buňňáka útlozubého. Genomická DNA byla získána z krve, brků peří a svalové tkáně a rozštěpena na 300–800 bp velké fragmenty, které byly vloženy do ssDNA. Pomocí softwaru Primer3 byly navrhnuty vhodné primery. Na polymorfismus bylo otestováno 36 párů primerů *cross-species* PCR amplifikací u 4 nepříbuzných jedinců buňňáka útlozubého a 3 jedinců buňňáka holubího. Autoři detekovali 26 polymorfních lokusů. Lokus Pacbel_00829 musel být z analýzy vyřazen pro vazbu na lokusy Pacbel_03731 a Pacbel_08509. Autoři následně otestovali 77 jedinců buňňáka útlozubého na polymorfismus. Lokus Pacbel_03731 vykazoval největší polymorfismus, 48 alel na lokus. Následným testováním těchto mikrosatelitů *cross-species* PCR amplifikací u buňňáka holubího (*Pachyptila desolata*), širokozobého (*P. vittata*), hrdliččího (*P. turtur*), Salvinova (*P. salvini*), modravého (*Halobaena caerulea*) a buňňáčka Wilsonova (*Oceanites oceanicus*) se u všech druhů projevila variabilita, 2–51 alel na lokus.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro analýzu byla použita krev šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*), která byla poskytnuta ze ZOO Dvůr Králové. Vedoucím bakalářské práce byla z krve izolována genomická DNA za použití fenol-chloroformové metody. Koncentrace zředěné DNA se pohybovala 5–15 µg/ml.

4.2 Použité chemikálie

- akrylamid (Sigma)
- aTaq DNA polymeráza (5U·µl⁻¹), M1241 (Promega)
- bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100 mmol·l⁻¹, 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' - tetramethylethylendiamin – TEMED (AppliChem)
- peroxodisíran amonný (Lachner)
- Rain-off - tekuté stěrače (Sheron)
- thiosíran sodný (Lachema)
- trishydroxymethylaminomethan - Tris (AppliChem)
- uhličitan sodný (Lachner)
- xylenová modř - Xylencyanol FF (AppliChem)

4.3 Použité roztoky

- akrylamid, zásobní 6% roztok
 - 420 g močoviny
 - 484 ml deionizované vody
 - 50 ml 10x TBE
 - 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu : N, N' - methylbisakrylamidu 19:1
 - všechny složky rozpustit, zfiltrvat a uložit do chladničky v tmavé lahvi
- dusičnan stříbrný, 0,1% roztok
 - 0,8 g AgNO₃
 - 800 ml deionizované vody
- fix/stop roztok
 - 80 ml ledové kyseliny octové
 - 800 ml deionizované vody
- hydroxid sodný, 1 mol·l⁻¹
 - 40 g hydroxidu sodného
 - doplnit deionizovanou vodou na 1 l
- kyselina dusičná, 1% roztok
 - 12 ml 65% kyseliny dusičné
 - 800 ml deionizované vody
- nanášecí pufr pro elektroforézu
 - 25 ml deionizované vody
 - 100 ml formamidu
 - 0,125 g bromfenolové modře
 - 0,125 g xylenové modře
- peroxodisíran amonný, 10% roztok
 - 1 g peroxodisíranu amonného
 - 10 ml deionizované vody
 - uchovávat v chladničce
- polyakrylamidový gel, 6% pracovní roztok
 - 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
 - 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈
 - 40 µl N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu
- reakční pufr pro PCR, 10x
 - 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu

- 80 ml deionizované vody
- upravit pH pomocí HCl na hodnotu 9,0
- 3,73 g KCl
- 1 ml Triton X-100
- rozpustit a doplnit do 100 ml
- roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu
 - 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
 - 3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu
- TBE pufr, zásobní roztok 10x
 - 55 g kyseliny borité
 - 108 g trishydroxymethylaminomethanu
 - 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol·l⁻¹, pH 8,0
 - deionizovanou vodou doplnit do 1000 ml
- vývojka
 - 24 g uhličitanu sodného
 - 800 ml deionizované vody
 - uložit do chladničky
 - před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

4.4 Laboratorní přístroje

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

- Termocykler GenePro (BIOER)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler TP XP (BIOER)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Ice Flaker (Brema IceMakers)

4.5 PCR amplifikace DNA pelikána skvrnozobého

PCR amplifikace se uskutečnila na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. Každá PCR reakce byla připravována pro šest vzorků vždy s jedním párem testovaných primerů.

1. Složky PCR mixu rozmrazit, zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Reagencie napipetovat do 1,5ml mikrozkušavek podle tabulky č. 1.

Tabulka č. 1: Složení PCR směsi pro šest vzorků.

Složky PCR mixu	Objem [μl]
Deionizovaná voda	39,9
Reakční pufr (10x)	6,7
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (20 μmol/l)	0,7
Primer F (10 μmol/l)	3,3
Primer R (10 μmol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5U/μl)	1,5

3. Připravenou PCR reakční směs znovu zvortexovat a zcentrifugovat.
4. Do každé z šesti 0,2ml PCR mikrozkušavek napipetovat 0,1, μl genomové DNA od jednoho jedince pelikána skvrnozobého a 9 μl PCR mixu.
5. Mikrozkušavky s objemem 10 μl vložit do termocyklu nastaveného podle schématu č. 1.

Schéma č. 1: Nastavení termocyklieru.

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

Celkem bylo ke *cross-species* PCR amplifikaci použito 213 párů primerů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého, přičemž 207 jich bylo navrženo přímo pro zástupce z řádu trubkonosí, 5 z nich pro zástupce řádu dlouhokřídlí a 1 z nich pro zástupce řádu pěvci. Všechny použité mikrosatelitní lokusy jsou uvedeny v tabulce č. 2–4.

Tabulka č. 2: Mikrosatelity izolované z řádu trubkonosí, které byly testovány na polymorfismus u pelikána skvrnozobého.

Čeleď	Druh	Mikrosatelit	Zdroj
Albatrosovití (Diomedidae)	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	Burg <i>et</i> Croxall, 2001
		De37	Burg <i>et</i> Croxall, 2004
	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 laysanský (<i>Phoebastria immutabilis</i>)	LAAL1, LAAL7, LAAL10, LAAL19	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
	albatros bělohřbetý (<i>P. albatrus</i>)	STAL4, STAL8, STAL12, STAL18, STAL20, STAL24	
albatros černonohý (<i>P. nigris</i>)	BFAL4, BFAL11, BFAL14, BFAL19, BFAL20		

Tabulka č. 2: Pokračování 1.

Čeleď	Druh	Mikrosatelit	Zdroj	
Buřňáčkovití (Hydrobatidae)	buřňáček madeirský (<i>Oceanodroma castro</i>)	Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B	Sun <i>et al.</i> , 2009	
		O110-39		
	buřňáček dlouhokřídlý (<i>O. leucorhoa</i>)	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	
		Omn1, Omn2, Omn3, Omn4, Omn6, Omn7, Omn8, Omn11, Omn14, Omn15, Omn16, Omn17, Omn21, Omn22, Omn23, Omn24, Omn25, Omn28	Bried <i>et al.</i> , 2012	
		Paegu2, Paegu3, Paegu4, Paegu7, Paegu8, Paegu10, Paegu13	Techow <i>et</i> O'Ryan, 2004	
	buřňák bělobradý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	buřňák šedý (<i>Calonectris diomedea</i>)	Cd1, Cd2, Cd3, Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd10, Cd11	Bried <i>et al.</i> , 2008
	buřňák taiko (<i>Pterodroma 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 havajský (<i>P. sandwicensis</i>)	Ptero01, Ptero02, Ptero03, Ptero04, Ptero05, Ptero06, Ptero07, Ptero08, Ptero09, Ptero10	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011	
	buřňák balearský (<i>Puffinus mauretanicus</i>)	Puff 1.5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2C, Puff G2F, Puff G11F, PuffPM2, Puff Sma6	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009	
buřňák světlonohý (<i>P. carneipes</i>)	Pc A105, Pc A107, Pc A115, Pc B11, PcB 109, Pc B115, Pc C104, Pc D3, Pc D103, Pc D109, Pc D121	Hardesty <i>et al.</i> , 2013		
Buřňákovití (Procellariidae)				

Tabulka č. 2: Pokračování 2.

Čeď	Druh	Mikrosatelit	Zdroj
Buňákovití (Procellariidae)	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, Patbel6, Patbel6, Patbel7	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012
	buňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	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	Moodley <i>et al.</i> , 2015

Tabulka č. 3: Mikrosatelity izolované z řádu dlouhokřídli a pěvci, které byly testovány na polymorfismus u pelikána skvrnozobého.

Řád	Čeď	Druh	Mikrosatelit	Zdroj
Dlouhokřídli	alkovití	alkoun obecný (<i>Cepphus quillemots</i>)	Cco5-21	Friesen <i>et al.</i> , 2006
	kulíkovití	kulík mořský (<i>Charadrius alexandrinus</i>)	Calex-01	Brown <i>et Jordan</i> , 2009 podle Küpper <i>et al.</i> , 2007
	rackovití	racek novozélandský (<i>Larus novaehollandiea scopulinus</i>)	RBG18, RBG18M, RBG29	Lawrence, 2008, Welch <i>et</i> Fleischer, 2011 podle Given <i>et al.</i> , 2002
Pěvci	lesňáčkovití	lesňáček žlutohý (<i>Dendroica petechia</i>)	Dpm01	Friesen <i>et al.</i> , 2006 podle Dawson <i>et al.</i> , 1997

4.6 Zpracování PCR produktů elektroforetickou separací

Níže popsaný postup je optimalizovaný pro použití vyhřívané sekvenční elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra. Rozměry použitých skel jsou 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťka gelu 0,4 mm.

1. Obě skla důkladně omýt vodou a saponátem za použití kartáčku. Plochu skel, která se bude dotýkat gelu opláchnout deionizovanou vodou, osušit a opláchnout 96% ethanolem.
2. Velké sklo ošetřit přípravkem na odpuzování vody (Rain-off) na ploše, která se bude dotýkat gelu. Po zaschnutí opláchnout deionizovanou vodou a usušit.
3. Malé sklo je nutné v digestoři ošetřit na ploše, na které bude přilepen gel, molekulárním lepidlem. Po zaschnutí opláchnout 96% ethanolem a usušit.
4. Velké sklo umístit do digestoře na polystyrenovou desku ošetřenou plochou nahoru. Na delší strany umístit 0,4 mm silné spacers, na které položit menší sklo ošetřenou plochou dolů. Gumu spaceru přitlačit k hraně menšího skla. Hrany skel jsou u jedné kratší hrany v zákrytu a na protilehlé delší sklo přečnívá o cca 2,5 cm. Na stranách spacerů sepnout skla dvěma klipsy.
5. V kádince připravit polyakrylamidový gel, ten nalít do mezery mezi skly po celé jejich šířce.
6. Mezi skla vyplněná gelem zasunout hřebínek rovnou stranou cca 5 mm hluboko, v místě hřebínku sepnout skla čtyřmi klipsy a nechat gel hodinu tuhnout.
7. Po ztuhnutí gelu odstranit klipsy a sklo umýt, především v okolí hřebínku od přebytečného polyakrylamidu.
8. Skla se ztuhnutým gelem a hřebínkem vložit menším sklem k hliníkové desce komůrky. Do katodového i anodového prostoru nalít 0,5x TBE pufr a vytáhnout hřebínek.
9. Vzniklou mezeru po hřebínku vyčistit od vzduchových bublin a přebytečného gelu injekční stříkačkou a plastovou špachtlí.
10. Katodový a anodový prostor uzavřít, ke zdroji stejnosměrného napětí připojit elektrody, nastavit hodnotu výkonu na 90 W, napětí na 3000 V a proud na 150 mA. Za těchto podmínek nechat gel nahřívát 30 min.
11. Během doby nahřívání si připravit vzorky. Ke každému PCR produktu přidat 5 μ l nanášecího pufru. Nachystané vzorky vložit před nanášením do gelu na 3 minuty do termocykleru nastaveného na teplotu 94 °C. Po uplynutí denaturace vložit do ledové tříště, aby se zabránilo renaturaci vláken DNA produktů.

12. Po skončení nahřívání gelu vypnout zdroj napětí, otevřít katodový prostor a opět vyčistit prostor mezi skly od zbytku polyakrylamidu a rozpuštěné močoviny. Do vyčištěné mezery vložit hřebínek 1 mm hluboko.
13. Do vzniklých mezer hřebínku napipetovat osmikanálovou pipetou po 2 μ l vzorku. Po napipetování všech vzorků uzavřít katodový prostor, připojit zdroj stejnosměrného proudu a nastavit výkon na 70 W, 3000 V a 150 mA. Doba elektroforetické separace se většinou pohybuje okolo 1,5 h.
14. V době, kdy probíhá elektroforetická separace nachystat roztoky k vyvolání: fix/stop roztok, 1% roztok HNO_3 , 0,1% roztok AgNO_3 a vývojku, kterou uložit do chladničky.
15. Po skončení elektroforetické separace vypnout zdroj elektrického napětí, odpojit elektrody, šroubem uvolnit prostor pro odtok pufry z katodového prostoru. Skla s gelem vyjmout a umístit na misku menším sklem nahoru. Vytáhnout hřebínek, spacers a ostrím nože od sebe oddělit skla od sebe.
16. Menší sklo vložit do fotomisky gelem nahoru na třepačku v digestoři a zalít gel fix/stop roztokem a nechat působit 20 min.
17. Po 20 minutách slít roztok zpátky do baňky a sklo s gelem třikrát promýt deionizovanou vodou. Do misky nalít 1% HNO_3 a nechat promývat 4–5 min.
18. Po uplynutí doby roztok vylít a sklo s gelem čtyřikrát promýt deionizovanou vodou.
19. Do 0,1% roztoku AgNO_3 přidat 1,2 ml formaldehydu. Tímto roztokem zalít gel a nechat 30 min působit, poté slít roztok zpátky do baňky. Gel vložit do fotomisky s deionizovanou vodou na 5 sekund.
20. Do vývojky přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l 1% thiosíranu sodného.
21. Gel vložit do další fotomisky a zalít předem připravenou vývojkou a sledovat vyvíjení hnědočerných stříbrem barvených proužků PCR produktů. Dříve, než se začne objevovat tmavé pozadí, zastavit vyvíjení, zalitím gelu fix/stop roztokem a nechat působit cca 2 min.
22. Sklo s gelem ponořit do deionizované vody a přenést do sušárny na 1 hod. Po vysušení vyhodnotit gel pomocí negatoskopu.
23. Vyhodnocený a nepotřebný gel ze skla odstranit ponořením do roztoku NaOH o koncentraci 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

5 Výsledky

V experimentální části bakalářské práce jsem používala metodu *cross-species* PCR amplifikace, pomocí ní jsem zjišťovala polymorfismus mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Celkově jsem otestovala 213 párů primerů, kdy 207 pocházelo od zástupců z řádu trubkonosí - 53 od druhů z čeledi albatrosovití, 100 od druhů z čeledi buňňákovití a 54 od druhů z čeledi buňňáčkovití. Dalšíh pět mikrosatelitů, které se projevíly jako polymorfní u několika druhů z řádu trubkonosí, pocházelo od druhů z řádu dlouhokřídlí - 3 mikrosatelity od racka novozélandského, 1 od kulíka mořského a 1 od alkouna obecného. Poslední mikrosatelit, který se projevil jako polymorfní u buňňáka tmavohřbetého (*Pterodroma phaeopygia*) z řádu trubkonosí, pocházel z řádu pěvci od lesňáčka žlutohého.

Nejdříve byly všechny mikrosatelity otestovány při teplotě *annealingu* 50 °C. Pokud byl produkt velmi slabý nebo mikrosatelit neposkytl produkt, teplota *annealingu* byla snižována až na 44 °C. Naopak u velmi silného produktu byla teplota *annealingu* zvyšována až na 65 °C. Elektroforetická separace probíhala 90 minut.

Z 213 testovaných mikrosatelitů bylo 22 polymorfních (tabulka č. 4). Dva mikrosatelity (De33 a Ptero 08) neposkytly žádný produkt, a to ani při snížení teploty na 44 °C. Zbylá část testovaných mikrosatelitů byla monomorfní.

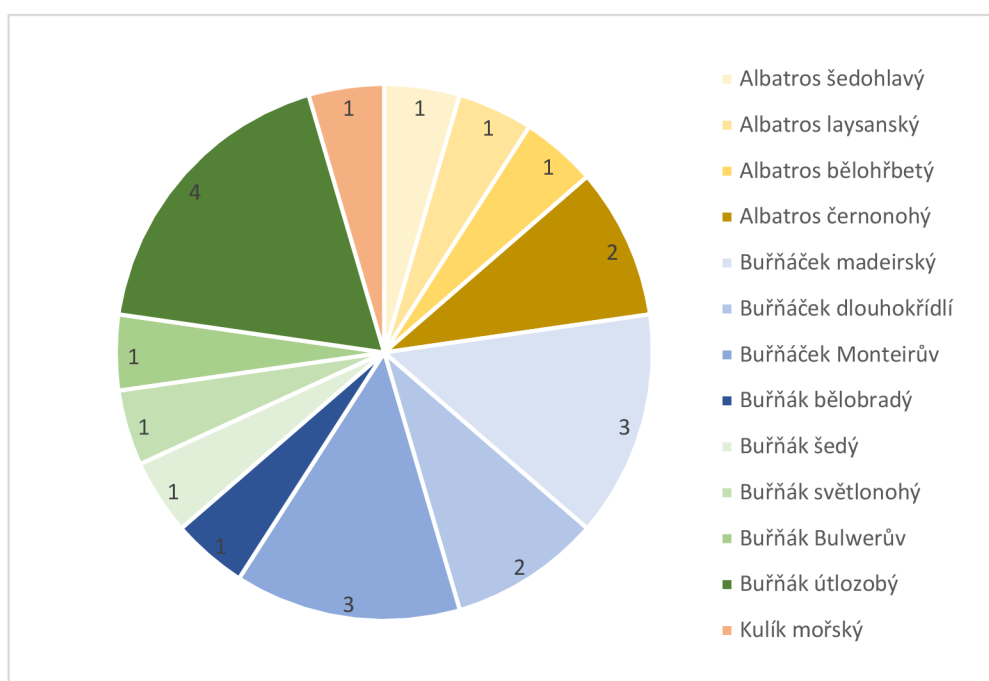
Tabulka č. 4: Dvacet dva polymorfních lokusů, které byly amplifikovány u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. V tabulce je uveden název lokusu s kódem z databáze GenBank, zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel (N), teplota *annealingu* (T_A) a doba trvání elektroforetické separace (ELFO).

Název lokusu (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	N	T_A [°C]	ELFO [min]
Dc21 (AF096802)	albatros šedohlavý	F: CGGGGGAAGTGAAGAAGATT R: TGGACAGCCAGTGGGATAAC	CA	2	53	90
LAAL7 (neuvedeno)	albatros laysanský	F: CAGCATGACCAAATCCATCC R: GTTTGGACACAAATGCCGTTCTTG	AGC	2	58	90
STAL18 (neuvedeno)	albatros bělohřbetý	F: CAGTTCCAAAGAAGGAAAACC R: GTTTGGAGTGGTCTTGGGTACAGC	ATG	2	65	90
BFAL4 (neuvedeno)	albatros černonohý	F: TGGGTCAGTTTACCTCTAGC R: GTTTGCCATTTTAAACTGTATTGGC	TC	2	64	90
BFAL14 (neuvedeno)		F: CAAGAAGCTATTATTAAGCTATTTGTTCC R: GGGTGTGAAATCGTTTCTGC	ATT	2	63	90
Oc28B (FJ238097)	buřňáček madeirský	F: GCGTTGACCAGCAAATAGTC R: GGAAGGCTACCACAATTCA	TG	2	55	90
Oc49 (FJ238098)		F: TGCTTCTGGATTTGTTTTGC R: CAAACCGTGTGACCCAGATA	CA	2	64	120
Oc63 (FJ238100)		F: TCACACCAACCTCCATGAAA R: AACGGGGAATATGTGGTTCTT	GA	2	56	120
O110-39 (FJ238106)	buřňáček dlouhokřídlí	F: TTAAGAACAGAGCCTGACTTG R: ACAAATCTCATGTCCTTGG	GT	2	48	90
Ole19 (FR696395)		F: GAAGGCTCTCAAGGGTCAAG R: TTTGGGAGAAGTTCAGTAGAAGAAC	GA/CA	2	60	90
Omn2 (JQ303227)	Buřňáček Monteirův	F: GATTTTCGTCCTTGTTCAAA R: AACAAATAACCAGGATTGATAATA	AC/AT	2	63	90

Tabulka č. 4: Pokračování.

Název lokusu (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	N	T _A [°C]	ELFO [min]
Omn8 (JQ303232)	buňňáček Monteirův	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTA	AC	4	59	90
Omn15 (JQ303235)		F: TGTCTCTGTTACCATCCCA R: AAGTGTTTGTTCAGCTTAGTC	ACGG/AC	2	62	90
Paequ3 (nevedeno)	buňňák bělobradý	F: TGTGGGTGCAGTAGAGCA R: CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	GA	3	64	180
Cd1 (EU029038)	buňňák šedý	F: CAAGCAGTCAGAACTCTGTG R: TGAGTTTGCCCTACATGAAC	TG/TC	3	61	90
Pc B109 (JX435475)	buňňák světloňohý	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATTGAGGATGTAGGTTC	CAA	2	65	120
Bb21 (HM171897)	buňňák Bulwerův	F: CTGATGTTCCAGGCCCTAAT R: CCTCTGAGCCAGCTAATTCC	TG	2	58	120
Patbel2 (JF288776)	buňňák útlozobý	F: GGTGTCATGCAACTGACTGAA R: CAATGGGAATGGCAGAGACT	CTAT	3	65	90
Patbel4 (JF288778)		F: TCGTCCATGTTAGAAGGCATC R: TGTGCCACGAGTTCTTTGTG	CTAT	2	55	90
Pacbel_07265 (nevedeno)		F: TCTGGTTTCACAAATACCTACTGC R: ACCCTGATTTCCAGTCCG	TG	2	51	90
Pacbel_15327 (nevedeno)		F: TGAAGGTATGCTGTCCTCC R: ACCTCATGTGTAACCTGCC	GT	5	48	90
Calex-01 (AM072445)	kulík mořský	F: CTTCTCCATTGTTGTCACCTCCAGT R: CTTGACTTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT/GA/GC	2	60	90

Z 213 mikrosatelitů, které byly amplifikované, jich 22 poskytlo polymorfni produkt. Úspěšnost nalezení polymorfniho produktu tedy činila 10,33 %. Z celkově nalezených polymorfniích lokusů jich 21 bylo izolováno od druhů z řádu trubkonosí a 1 z řádu dlouhokřídli (Calex-01 od kulíka mořského). Z čeledi buňňákovití jsem celkově testovala 100 párů primerů, polymorfniích jsem našla osm, úspěšnost činí 8 %. Od druhů z čeledi buňňáčkovití jsem testovala 54 mikrosatelitů, z toho 8 jich bylo polymorfniích, úspěšnost amplifikace polymorfniho mikrosatelitu je 14,81 %. Z čeledi albatrosovití jsem otestovala 53 mikrosatelitů, z toho 5 bylo polymorfniích, úspěšnost amplifikace polymorfniho mikrosatelitu byla 9,43 %. Nejvíce polymorfniích lokusů v rámci druhu jsem našla u zástupců z čeledi buňňákovití. Na obrázku č. 2 jsou znázorněny polymorfni mikrosatelity u pelikána skvrnozobého podle druhů, ze kterých byly původně izolovány.



Obrázek č. 2: Dvacet dva mikrosatelitů polymorfniích u pelikána skvrnozobého rozdělených podle druhů, ze kterých byly izolovány. Číslo v grafu značí počet polymorfniích lokusů od určitého druhu. Žlutě jsou označeny druhy z čeledi albatrosovití, modře zástupci čeledi buňňáčkovití, zeleně z čeledi buňňákovití a oranžově zástupce z řádu dlouhokřídli.

U 22 mikrosatelitů bylo nalezeno 2–5 alel. V 17 případech bylo u polymorfniích lokusů detekováno po dvou alelách, u tří mikrosatelitů po 3 alelách, u jednoho mikrosatelitu čtyři alely a u jednoho mikrosatelitu 5 alel. Procentuální zastoupení

v případě mikrosatelitu se dvěma alelami činí 77,27 %, mikrosatelitů se třemi alelami 13,63 % a se čtyřmi a pěti alelami po 4,5 %.

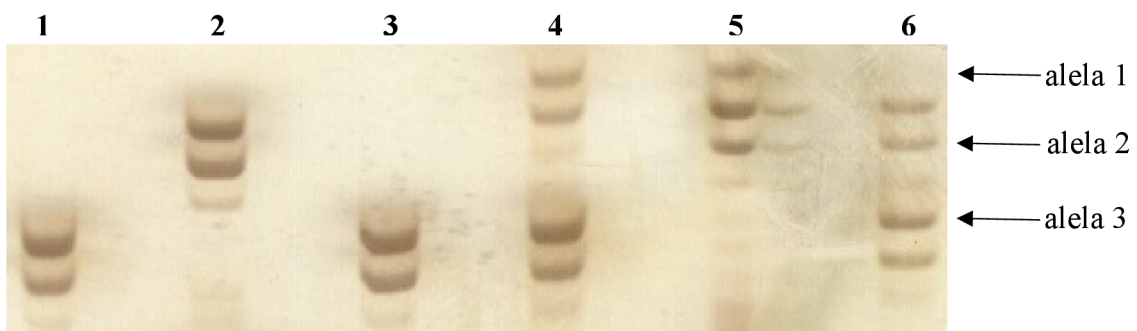
V tabulce č. 5 jsou uvedeny genotypy 22 polymorfních mikrosatelitů, které byly amplifikovány u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.

Tabulka č. 5: Genotypy 22 polymorfních mikrosatelitních lokusů získaných při *cross-species* PCR amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. V tabulce je uveden název mikrosatelitního lokusu, zdrojový druh, počet alel a genotyp.

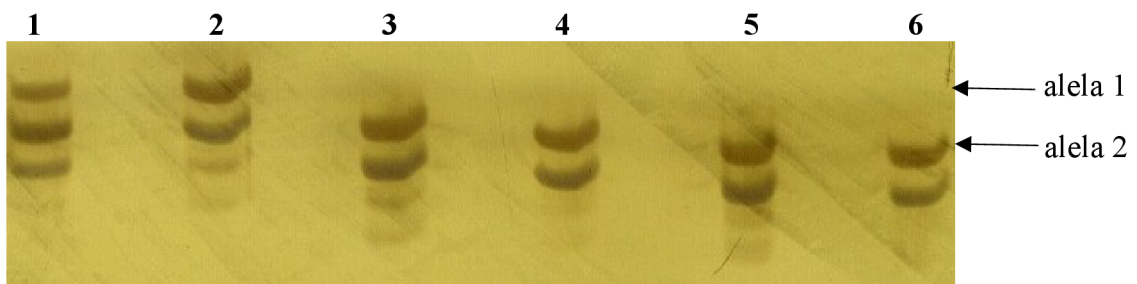
Mikrosatelit	Zdrojový druh	Počet alel	Genotypy jedinců					
			1	2	3	4	5	6
Dc21	albatros šedohlavý	2	$1/2$	$1/1$	$1/2$	$1/1$	$1/2$	$1/1$
LAAL7	albatros laysanský	2	$1/2$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/2$
STAL18	albatros bělohřbetý	2	$2/2$	$2/2$	$2/2$	$2/2$	$1/2$	$2/2$
BFAL4	albatros černonohý	2	$1/1$	$2/2$	$2/2$	$2/2$	$1/1$	$1/1$
BFAL14		2	$2/2$	$2/2$	$1/2$	$2/2$	$1/2$	$2/2$
Oc28B	buřňáček madeirský	2	$1/2$	$1/1$	$2/2$	$2/2$	$2/2$	$2/2$
Oc49		2	$1/1$	$1/1$	$2/2$	$1/2$	$1/1$	$2/2$
Oc63		2	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/2$	$1/1$
O110-39	buřňáček dlouhokřídlý	2	$1/2$	$1/2$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/2$
Ole19		2	$1/1$	$1/2$	$1/2$	$2/2$	$1/2$	$1/1$
Omn2	buřňáček Monteirův	2	$1/2$	$2/2$	$1/1$	$1/2$	$1/1$	$1/2$
Omn8		4	$2/2$	$2/2$	$1/2$	$2/3$	$2/3$	$2/4$
Omn15		2	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/2$
Paequ3	buřňák bělobradý	3	$1/2$	$3/3$	$2/3$	$2/3$	$2/3$	$2/2$
Cd1	buřňák šedý	3	$3/3$	$2/2$	$3/3$	$1/3$	$1/3$	$2/3$
Pc B109	buřňák světlonohý	2	$2/2$	$1/1$	$1/2$	$2/2$	$1/2$	$1/2$
Bb21	buřňák Bulwerův	2	$1/2$	$1/1$	$1/2$	$1/2$	$2/2$	$1/1$
Patbel2	buřňák útlozobý	3	$3/3$	$2/3$	$2/2$	$1/2$	$1/2$	$2/2$
Patbel4		2	$1/1$	$1/2$	$1/2$	$1/1$	$1/1$	$1/2$
Pacbel_07265		2	$3/3$	$2/3$	$1/3$	$2/2$	$3/3$	$2/3$
Pacbel_15327		5	$3/4$	$2/4$	$1/5$	$3/5$	$5/5$	$5/5$
Calex-01		kulík mořský	2	$1/1$	$1/1$	$1/2$	$1/1$	$1/1$

Dvacet mikrosatelitů mělo dvě nebo tři alely, pouze jeden měl čtyři a jeden pět alel. Mikrosatelit se 4 alelami (Omn8) byl velmi dobře hodnotitelný. Bohužel mikrosatelit s 5 alelami (Pacbel_15327) byl špatně hodnotitelný, tudíž pravděpodobně nebude vhodný k dalším studiím. Mikrosatelit BFAL4 vykazoval polymorfismus, ale všichni jedinci byly homozygoti.

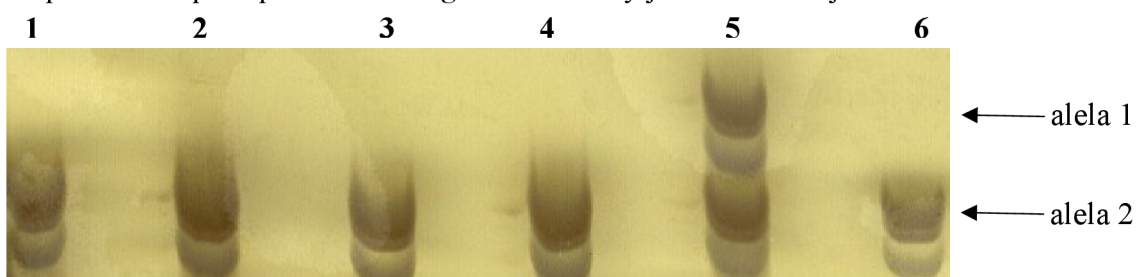
Na následujících fotografiích elektroforetogramů jsou vybrané mikrosatelity Cd1 (obrázek č. 3), Oc28B (obrázek č. 4), STAL18 (obrázek č. 5) a Patbel2 (obrázek č. 6) po provedené *cross-species* PCR amplifikace a elektroforetické separace u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.



Obrázek č. 3: Elektroforetogram mikrosatelitu Cd1 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. Šipkami jsou vyznačeny alely tohoto lokusu, které jsem amplifikovala při teplotě *annealingu* 61 °C. Čísla jsou označení jedinci.



Obrázek č. 4: Elektroforetogram mikrosatelitu Oc28B testovaného u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. Šipkami jsou vyznačeny alely tohoto lokusu, které jsem amplifikovala při teplotě *annealingu* 55 °C. Čísla jsou označení jedinci.



Obrázek č. 5: Elektroforetogram mikrosatelitu STAL18 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. Šipkami jsou vyznačeny alely tohoto lokusu, které jsem amplifikovala při teplotě *annealingu* 65 °C. Čísly jsou označení jedinci.



Obrázek č. 6: Elektroforetogram mikrosatelitu Patbel2 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. Šipkami jsou vyznačeny alely tohoto lokusu, které jsem amplifikovala při teplotě *annealingu* 65 °C. Čísly jsou označení jedinci.

6 Diskuze

V této bakalářské práci jsem se věnovala testování 213 párů primerů pomocí *cross-species* PCR amplifikace. 207 mikrosatelitů bylo izolováno od druhů z řádu trubkonosí, Dalších šest mikrosatelitů bylo polymorfních u trubkonosých, ale jejich zdrojové druhy pocházejí z řádu dlouhokřídlí (z čeledí alkovití, kulíkovití, rackovití) a z řádu pěvci (čeleď lesňáčkovití). U šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého jsem vyhodnotila 22 mikrosatelitních lokusů jako polymorfních. U 2 lokusů jsem nezískala žádný produkt, a to ani v případě kdy byla PCR opakovaná a teplota *annealingu* snížena až na 44 °C.

Pomocí *cross-species* PCR amplifikace jsem otestovala 53 párů primerů, které byly izolovány od druhů z čeledi albatrosovití. U šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého bylo nalezeno 5 polymorfních lokusů od druhů z této čeledi, které byly publikovány ve dvou článcích a pocházely od albatrosa šedohlavého (*Diomedea chrysostoma*), bělohřbetého (*Phoebastria immutabilis*) a laysanského (*P. immutabilis*). Dva páry primerů pocházely od albatrosa černonohého (*P. nigripes*).

Dvacet šest polymorfních mikrosatelitních lokusů charakterizovala Burg (1999) u albatrosa šedohlavého a stěhovavého. Pro PCR amplifikaci použila speciální PCR program, kdy prvních sedm cyklů mělo teplotu *annealingu* 48 °C a 35 cyklů mělo teplotu *annealingu* 52 °C. Autorka našla u mikrosatelitu Dc21 tři alely u 50 jedinců albatrosa šedohlavého. Já jsem při teplotě *annealingu* 53 °C detekovala 2 alely.

Charakterizaci 15 polymorfních lokusů u albatrosa černonohého, laysanského a bělohřbetého provedli Hernandez *et al.* (2014). Všechny mikrosatelity testovali při stejné teplotě *annealingu*, konkrétně při 60 °C. Autoři detekovali u mikrosatelitu LAAL7 u 12 jedinců albatrosa laysanského 4 alely, u 36 jedinců albatrosa černonohého byly nalezeny 4 alely, u 3 jedinců albatrosa bělohřbetého byly nalezeny 2 alely. Já jsem u šesti jedinců pelikána skvrnozobého našla 2 alely při teplotě T_A 58 °C. U mikrosatelitu STAL18 u 36 jedinců albatrosa černonohého a 12 jedinců laysanského autoři našli 7 alel. Při testování tohoto lokusu u pelikána skvrnozobého jsem detekovala 2 alely při teplotě *annealingu* 65 °C. U mikrosatelitu BFAL4 autoři našli u 36 jedinců albatrosa černonohého 8 alel, u 12 jedinců albatrosa laysanského 4 alely a u 3 jedinců albatrosa bělohřbetého našli 2 alely. Já jsem u tohoto mikrosatelitu našla při teplotě 64 °C dvě alely. U mikrosatelitu BFAL14 autoři našli u 36 jedinců čtyři alely, u dvanácti jedinců albatrosa laysanského autoři našli 3 alely a u třech jedinců albatrosa bělohřbetého

nalezli 3 alely. Já jsem u mikrosatelitu BFAL14 při teplotě *annealingu* 63 °C detekovala 2 alely.

Pomocí *cross-species* PCR amplifikace jsem testovala 54 párů primerů, které byly izolovány od zástupců z čeledi buňňáčkovití. U šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého jsem našla 8 polymorfních lokusů z této čeledi, kdy tři mikrosatelity pocházejí od buňňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*), 2 od buňňáčka dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*) a 3 od buňňáčka Monteirova (*O. monteiroi*).

Deset mikrosatelitních lokusů u 27 jedinců buňňáčka madeirského, 22 jedinců buňňáčka Monteirova a 24 jedinců buňňáčka dlouhokřídlého popsali Sun *et al.* (2009). Pomocí *cross-species* PCR amplifikace jsem detekovala 3 polymorfní lokusy u pelikána skvrnozobého. Mikrosatelit Oc28B, který byl původně izolován pro buňňáčka madeirského, u kterého autoři našli 3 alely, použili i pro *cross-species* PCR amplifikaci u buňňáčka Monteirova, kdy autoři našli 3 alely. Já jsem našla 2 alely při teplotě *annealingu* 55 °C. U mikrosatelitu Oc49 autoři našli 3 alely u buňňáčka Monteirova a dlouhokřídlého. Já jsem při teplotě *annealingu* 64 °C detekovala 2 alely. Mikrosatelit Oc63 byl polymorfní u buňňáčka madeirského a dlouhokřídlého se 4 alelami. Tento mikrosatelit měl u pelikána skvrnozobého 2 alely při teplotě *annealingu* 56 °C. Mikrosatelit Ol10-39 autoři našli jako polymorfní se 3 alelami u buňňáčka dlouhokřídlého a u buňňáčka madeirského a Monteirova, kde našli osm alel. Já jsem u tohoto lokusu detekovala 2 alely při T_A 48 °C.

Bicknel *et al.* (2011) izolovali 26 polymorfních mikrosatelitů u 24 jedinců buňňáčka dlouhokřídlého. U mikrosatelitu Ole19 autoři našli 8 alel při teplotě *annealigu* 60 °C. Při *cross-species* PCR amplifikaci u pelikána skvrnozobého jsem u tohoto mikrosatelitu našla 2 alely při T_A 60 °C.

U buňňáčka Monteirova Bried *et al.* (2012) popsali 18 mikrosatelitů při teplotě *annealingu* 58 °C. Autoři variabilitu testovali u 125 jedinců buňňáčka Monteirova. Při *cross-species* PCR amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého byly 3 z těchto mikrosatelitů polymorfní. U mikrosatelitu Omn2 autoři našli 7 alel, já jsem při teplotě *annealingu* 63 °C detekovala 2 alely. U mikrosatelitu Omn8 amplifikovali autoři 10 alel, já jsem při T_A 59 °C našla 4 alely. Mikrosatelit Omn15 měl u buňňáčka Monteirova 17 alel, já jsem u pelikána skvrnozobého detekovala dvě alely při teplotě *annealingu* 62 °C.

Bylo k dispozici 100 párů primerů, se kterými byla provedena *cross-species* PCR amplifikace u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. Po otestování těchto mikrosatelitů, jsem našla 8 lokusů jako polymorfní. Po jednom mikrosatelitu pocházelo od buňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), buňáka šedého (*Calonectris diomedea*), buňáka světlonohého (*Puffinus carneipes*) a buňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*). Čtyři polymorfní mikrosatelity pocházejí od buňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*).

Šest polymorfních dinukleotidových mikrosatelitních lokusů izolovali a charakterizovali Techow *et al.* (2004) u buňáka bělobradého. Při *cross-species* PCR amplifikaci u pelikána skvrnozobého byl nalezen 1 polymorfní mikrosatelit - Paequ3. Autoři našli u 93 jedinců při teplotě *annealingu* 55 °C u mikrosatelitu Paequ3 devět alel. Já jsem u tohoto mikrosatelitu našla 3 alely, při teplotě T_A 64 °C.

Bried *et al.* (2008) popsali jedenáct dinukleotidových mikrosatelitů u buňáka šedého. Všechny lokusy testovali při T_A 58 °C u 43 jedinců. U pelikána skvrnozobého vykazoval polymorfismus jeden lokus - Cd1. Autoři u tohoto mikrosatelitu našli 6 alel, já jsem u něho našla 3 alely při T_A 61 °C.

Jedenáct polymorfních lokusů popsali u buňáka světlonohého Hardesty *et al.* (2013). U pelikána skvrnozobého jsem našla jeden polymorfní mikrosatelit - Pc B109, u kterého autoři našli u 84 jedinců 5 alel při T_A 57 °C. Já jsem při teplotě *annealingu* 65 °C detekovala 2 alely.

Andris *et al.* (2010) izolovali jedenáct dinukleotidových mikrosatelitů u buňáka Bulwerova. u lokusu Bb21 našli 3 alely při teplotě *annealingu* 58 °C. Já jsem u tohoto mikrosatelitu našla 2 alely při stejné teplotě *annealingu*.

Sedm polymorfních mikrosatelitů charakterizovali Quillfeldt *et al.* (2012) u 68 jedinců buňáka útlozobého. Při *cross-species* PCR amplifikaci u pelikána skvrnozobého dva ze sedmi lokusů byly polymorfní. Autoři detekovali 16 alel na lokusu Patbel2, já jsem u tohoto lokusu našla 3 alely při teplotě T_A 65 °C. U lokusu Patbel4 detekovali 9 alel, já jsem našla 2 alely při teplotě T_A 55 °C. Autoři teplotu *annealingu* neuvádějí.

U buňáka útlozobého popsali Moodley *et al.* (2015) dvacet pět polymorfních lokusů. U pelikána skvrnozobého při *cross-species* PCR amplifikaci jsem našla tři lokusy polymorfní. U mikrosatelitů Pacbel_07265 a Pacbel_15327 autoři u 77 jedinců detekovali 9 a 5 alel při dvou teplotách *annealingu* 56 °C (30 cyklů) a 53 °C (8 cyklů). Já jsem našla u mikrosatelitu Pacbel_07265 dvě alely při T_A 51 °C. U mikrosatelitu

Pacbel_15327 jsem našla shodný počet alel jako autoři, konkrétně 5 alel, ale při teplotě *annealingu* 48 °C.

Küpper *et al.* (2007) detekovali u mikrosatelitu Calex-01 deset alel u 42 jedinců kulíka mořského z řádu dlouhokřídli při teplotě *annealingu* 62 °C. Tento lokus byl dále použit pro testování u 340 jedinců buňáka trinidadského z řádu buňákovití, kde Brown *et Jordan* (2009) našli alely čtyři při teplotě *annealingu* 62 °C. Já jsem u pelikána skvrnozobého detekovala alely dvě při teplotě *annealingu* 60 °C.

Laboratoř populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci se zabývá testováním mikrosatelitů metodou *cross-species* PCR amplifikace druhů z kladu Aequorlitorhithes. Dále porovnávám své výsledky s pracemi, kdy autorky testovaly stejné mikrosatelity u nesýta indomalajského, potápky roháče, plameňáka karibského a růžového, dále u pelikána bílého, afrického a kadeřavého.

Nedvědová (2015) provedla *cross-species* PCR amplifikaci u nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) s 212 mikrosatelity vyhodnotila 46 lokusů polymorfních. Při testování u pelikána skvrnozobého jsem našla 11 polymorfních lokusů stejných jako uvedla autorka.

U potápky roháče (*Podiceps cristatus*) *cross-species* PCR amplifikací, kterou provedla Janušová (2015) ve své bakalářské práci našla 20 polymorfních mikrosatelitů. Tyto mikrosatelity o dva roky později charakterizovala ve své diplomové práci (Janušová, 2017) na 13 jedincích potápky roháče. Já jsem detekovala 6 stejných polymorfních mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého.

Strejčková ve své bakalářské práci (2016) testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) 213 párů primerů, z nichž 50 bylo polymorfních. Dále ve své diplomové práci (Strejčková, 2018) charakterizovala tyto polymorfní mikrosatelity na 30 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského. U pelikána skvrnozobého jsem našla 10 stejných polymorfních lokusů.

Cross-species PCR amplifikaci u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) provedla ve své bakalářské Kůrová (2017). Z 213 otestovaných párů primerů jich 48 poskytlo polymorfní produkt. Tyto polymorfní mikrosatelity dále charakterizovala Zlochová (2019) ve své diplomové práci na 22 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového. Při testování stejných párů primerů u pelikána skvrnozobého se 9 polymorfních mikrosatelitů shodovalo s plameňákem růžovým.

Kopečná (2018) našla 24 polymorfních mikrosatelitů pomocí *cross-species* PCR amplifikace u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Následně tyto mikrosatelity charakterizovala ve své diplomové práci (Kopečná, 2020) na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Otestováním stejných párů primerů u pelikána skvrnozobého jsem našla 7 mikrosatelitních lokusů.

Verešová (2018) ve své bakalářské práci testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace 213 párů primerů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*), 12 mikrosatelitů bylo vyhodnoceno jako polymorfních. Tyto polymorfní lokusy dále testovala ve své diplomové práci (Verešová, 2020), kde mikrosatelit Dc19 vyřadila jako monomorfní. U 6 mikrosatelitů, které Verešová označuje jako polymorfní u pelikána kadeřavého, jsem i já zjistila polymorfismus u pelikána skvrnozobého.

Cross-species PCR amplifikací mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) se zabývala Hudzieczková (2019). při testování našla 42 polymorfních mikrosatelitů, kdy 11 polymorfních mikrosatelitů jsem amplifikovala i u pelikána skvrnozobého.

V tabulce č. 6 uvádím vybrané druhy Aequorlitorornithes, které byly zpracovány v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, a které byly otestovány páry primerů z řádu trubkonosí. Tabulka je seřazena tak, že vertikálně jsou seřazeny mikrosatelity od toho, který poskytoval polymorfní produkt u největšího počtu testovaných druhů a dole jsou dva mikrosatelity, které byly polymorfní pouze u pelikána skvrnozobého. Druhy jsou uspořádány zleva doprava tak, že první je ten, na kterém jsem testovala já a dále z hlediska počtu společných polymorfních mikrosatelitů od největší shody po nejmenší. Z hlediska *cross-species* využitelnosti se nejlépe ukazuje Omn8, který je polymorfní u dalších šesti druhů a vykazuje od tří do sedmi alel. Dále LAAL7, Paequ3 a Bb2, kteří jsou polymorfní u dalších pěti druhů. Calex-01 v rámci testování v laboratoři byl polymorfní u tří druhů pelikánů, jednoho druhu plameňáka a jednoho druhu nesyta malajského, dále je známo, že je polymorfní u druhu z řádu dlouhokřídlí u kulíka mořského (Küpper *et al.*, 2007) a u druhu z řádu buňňákovití u buňňáka trinidadského (Brown *et Jordan*, 2009).

Tabulka č. 6: Souhrn polymorfních mikrosatelitů testovaných v této práci na pelikánu skvrnozobém, které byly zároveň polymorfní u nesyta indomalajského (Nedvědová, 2015), plameňáka karibského (Strejčková, 2018), růžového (Zlochová, 2019), pelikána afrického (Kopečná, 2020), bílého (Huzieczková, 2019) a potápky roháče (Janušová, 2017). V tabulce je uveden počet nalezených alel, M = monomorfní lokus. Čísla u jednotlivých druhů značí počet testovaných jedinců.

Mikrosatelit	Pelikán skvrnozobý (6)	Pelikán bílý (6)	Nesyt indomalajský (6)	Plameňák karibský (30)	Plameňák růžový (22)	Pelikán africký (12)	Potápka roháč (13)	Pelikán kadeřavý (41)
Omn8	4	4	5	7	8	3	9	M
LAAL7	2	M	3	6	4	2	M	2
Paequ3	2	3	4	3	3	3	M	M
Bb21	2	2	2	M	2	M	7	2
BFAL4	2	2	M	2	2	2	M	2
Oc28B	2	3	3	3	4	M	M	M
Oc49	2	M	5	3	6	M	2	M
Pc B109	2	3	M	4	M	2	12	M
Calex-01	2	2	2	M	2	M	M	3
Patbel2	3	4	M	M	M	2	6	M
Pacbel 07265	2	M	2	3	2	M	M	M
BFAL14	2	M	M	4	M	M	M	M
Oc63	2	M	2	M	M	M	M	2
Cd1	3	4	M	M	M	M	M	M
Pacbel 15327	5	2	2	M	M	M	M	2
STAL18	2	M	2	M	M	M	M	M
Ole19	2	2	M	M	M	M	M	M
Omn2	2	M	M	M	M	2	M	M
Patbel4	2	M	M	2	M	M	M	M
O110-39	2	M	M	M	M	M	8	M
Dc21	2	M	M	M	M	M	M	M
Omn15	2	M	M	M	M	M	M	M

V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci bylo u nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého otestováno 743 mikrosatelitů ve čtyřech pracích (včetně této) - Mikulová (2010), Buržáková (2011), Šuláková (2017), z toho 84 mikrosatelitů vykazovalo polymorfismus.

7 Závěr

V rámci bakalářské práce jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace otestovala 213 párů primerů na 6 nepříbuzných jedincích pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Mikrosatelity, které byly používány k testování, byly původně navrženy pro druhy z řádů trubkonosí, dlouhokřídlí a pěvci. Z řádu trubkonosí bylo použito 207 párů primerů, které pocházely od druhů z čeledí albatrosovití, buňňáčkovití a buňňákovití, dalších šest mikrosatelitů pocházelo z řádu dlouhokřídlí a pěvci a již byly použity jako *cross-species* u některého druhu z řádu trubkonosí.

Testováním jsem zjistila, že dva mikrosatelity neamplifikovaly žádný produkt ani při teplotě *annealingu* 44 °C, 189 jich bylo monomorfních a u 22 jsem našla polymorfní produkt (přibližně 10% úspěšnost). Pro každý polymorfní lokus byla optimalizována teplota *annealingu* (T_A) a byly určeny alely a genotypy. Nejvíce alel, konkrétně pět, bylo nalezeno u lokusu Pacbel_15327, který byl původně popsán pro buňňáka útlozobého. U zbývajících mikrosatelitů byly nalezeny 2–4 alely.

Celkově jsem detekovala 5 polymorfních lokusů izolovaných od druhů z čeledí albatrosovití, po 8 jich bylo popsáno od druhů z čeledí buňňákovití a buňňáčkovití a 1 mikrosatelit pocházel z řádu dlouhokřídlí od kulíka mořského.

8 Použitá literatura

- 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, dostupné online na <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>, navštíveno dne 1. 2. 2021.
- Anonymous (2017): *Pelecanus philippensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017. dostupné online na: <https://www.iucnredlist.org>, navštíveno dne 10. 10. 2020.
- Bennet, P. (2000): Demystified...microsatellites. *Molecular Pathology*, 53, 177–183.
- Bicknell, J. W. A., Dawson, A. D., Horsburgh, J. G., Knight, E. M., Bilton, T., D., Votier, C. S. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's storm petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). *Conservation Genetic Resources*, 3, 711–716.
- Bried, J., Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*. Manuskript, dostupné online na <https://www.yumpu.com/en/browse>, navštíveno dne 24. 1. 2021.
- Bried, J., Dubois, M.-P., Jouventin, P., Santos, S. R. (2008): Eleven polymorphic microsatellite markers in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*, and cross-species amplification on threatened Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 8, 602–604.
- Brown, M. R., Jordan, C. W. (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.

- Buržáková, K. (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Dawson, S. D., Horsburgh, J. G., Küpper, C., Stewart, K. R. I., Ball, D. A., Durrant, L. K., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, Á., Krupa, P. A., Lee, J-W., Martin Galvéz, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, G. L., 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. (Eds.) (1992): Handbook of the birds of the world. Vol. 1 Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona, 436–456.
- Dubois, M-P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology*, 5, 905–907.
- Friesen, L. V., González, A. J., Cruz-Delgado, F. (2006): Population genetic structure and conservation of the Galápagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Conservation Genetics*, 7, 105–115.
- Gaisler, J., Zima, J. (2018): Zoologie obratlovců. Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha, 463–488.
- Gibb C. G., Kennedy M., Penny M. (2013): Beyond phylogeny: peleciform and ciconiiform birds, and long-term niche stability. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, 229–238.
- Given, D. A., Mills, A., Baker, 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.
- Gokula V. (2011): Breeding biology of the Spot-billed Pelican (*Pelecanus philippensis*) in Karaivetti Bird Sanctuary, Tamil Nadu, India. *Chinese Birds*, 2, 101–108.
- Gonzalez, E. G, Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwaters, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1044–1046.
- Hackett J. S., Kimball T. R., Reddy S., Bowie K. C. R., Braun L. E., Braun J. M., Chojnowski L. J., Cox A. W., Han K., Harshman J., Huddleston J. C., Mark, D. B., Miglia J. K., Moore S. W., Sheldon H. F., Steadman W. D., Witt C. C.,

- Yuri T. (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science*, 320, 1763–1768.
- Hanzák, J., Hudec, K., 1974. Světem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci 2, Praha: Albatros.
- Hardesty, D. B., 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, D. L., Lounsberry, T. Z., Collins, W. P., Henry, W. R., Newsome, D. S., Sacks, N. B. (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.
- Hudzieczková, A. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Janušová, D. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Janušová, D. (2017): Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorornithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y. W., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A., Weber, C. C., da Fonseca, R. R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W. C., Ray, D., Green, R. E., Bruford, M. W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y., Derryberry, E. P., Bertelsen, M. F., Sheldon, F. H., Brumfield, R. T., Mello, C. V., Lovell, P. V., Wirthlin, M., Schneider, M. P. C., Prosdocimi, F., Samaniego, J. A., Velazquez, A. M. V., Alfaro-Núñez, A., Campos, P. F., Petersen, B., Sicheritz-Ponten, T., Pas, A., Bailey, T., Scofield,

- P., Bunce, M., Lambert, D. M., Zhou, Q., Perelman, P., Driskell, A. C., Shapiro, B., Xiong, Z., Zeng, Y., Liu, S., Li, Z., Liu, B., Wu, K., Xiao, J., Yinqi, X., Zheng, Q., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Smeds, L., Rheindt, F.E., Braun, M., Fjeldsa, J., Orlando, L., Barker, F. K., Jönsson, K. A., Johnson, W., Koepfli, K. P., O'Brien, S., Haussler, D., Ryder, O. A., Rahbek, C., Willerslev, E., Graves, G. R., Glenn, T. C., McCormack, J., Burt, D., Ellegren, H., Alström, P., Edwards, S. V., Stamatakis, A., Mindell, D. P., Cracraft, J., Braun, E. L., Warnow, T., Jun, W., Gilbert, M. T. P., Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.
- Kennedy M., Taylor A. S., Nádvořník P., Spencer G. H. (2013): The phylogenetic relationships of the extant pelicans inferred from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 215–222.
- Kocher, D. T., Thomas, K. W., Meyer, A., Edwards, V. S., Pääbo, S., Villablanca, X. F., Wilson, C. A. (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 86, 6196–6200.
- Kopečná, K. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kopečná, K. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Küpper, C., Horsburgh, G. J., Dawson, D. A., Ffrench-Constant, R., Székely, 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 (*Pterodroma magentae*). Disertační práce. Auckland,

- New Zealand, dostupné online na <https://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657> navštíveno dne 24. 1. 2021.
- 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.
- Nedvěďová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Oliveira, J. E., Pádua, G. J., Zucchi, I. M., Vencovsky, R., Vieira, C. L. M. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Prum, O. R., Berv, S. J., Dornburg, A., Field, J. D., Townsend, 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, F. J., 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.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener, S., Krawetz, S. A.: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, 365–386.
- Sia, A. E., Kokoska J. R., Dominska, M., Greenwell, P., Petes, D. T. (1997): Microsatellite Instability in East: Dependence on Repeat Unit Size and DNA Mismatch Repair Genes. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 2851–2858.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řád 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.
- Šťastný, K., Hudec, K. (2016): Ptáci: *Aves*. Díl I. Praha: Academia, 98–102.
- Šuláková, M. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability on simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463–6471.
- Techow, M. S. M. N., 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): Microsatellite in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Tuinen M., Butvill B. D., Kirsch W. A. J., Hedges B. S. (2001): Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *The Royal Society of London for Improving Natural Knowledge*, 268, 1345–1350.
- 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.
- Verešová, D. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) a u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Welch, J. A., Fleischer, C. R. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 581–584.
- Zlochová, A. (2019): Amplifikace vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.