

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2016**

**Beáta Strejčková**

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



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů  
z řádu trubkonosí u plameňáka karibského  
(*Phoenicopterus ruber*)**

**Bakalářská práce**

**Beáta Strejčková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2016**

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

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

V Olomouci dne 4. 5. 2016

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. nejen za odborné rady a materiály, které mi poskytl při zpracování teoretické i experimentální části této bakalářské práce, ale i za ochotu a čas, který mi věnoval.

## Souhrn

V této bakalářské práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) za pomoci *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitních lokusů izolovaných od zástupců řádu trubkonosí.

V teoretické části jsem se zaměřila na problematiku zařazení plameňáka karibského do systému a změny, kterými toto zařazení v průběhu času procházelo, popsala jsem řád plameňáci, čeleď plameňákovití a také plameňáka karibského. Dále jsem se věnovala obecné charakteristice mikrosatelitů, výskytu mikrosatelitů v ptačím genomu a popisu *de novo* a *cross-species* mikrosatelitů pro plameňáka karibského a mikrosatelitů izolovaných od druhů z řádu trubkonosí.

V experimentální části jsem na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského testovala *cross-species* PCR amplifikaci celkem 213 mikrosatelitů, z čehož 207 představovalo všechny *de novo* mikrosatelity doposud odvozené od zástupců z řádu trubkonosí a u zbylých 6 se jednalo o *cross-species* mikrosatelity polymorfní u zástupců z řádu trubkonosí, původně izolované u zástupců z řádu dlouhokřídlí a pěvci. Všechny testované mikrosatelity poskytly monomorfní nebo polymorfní produkt. Z 52 polymorfních mikrosatelitů jsem 2 vyřadila jako nehodnotitelné a u jednoho mikrosatelitu jsem pozorovala 2 polymorfní oblasti. Celkem jsem tedy našla 50 párů primerů, které u plameňáka karibského amplifikují 51 polymorfních produktů.

## Summary

In this bachelor thesis I dealt with the searching for polymorphic microsatellites in the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber*) using the method of cross-species PCR amplification of microsatellite loci isolated from representatives of the order Procellariiformes.

In the theoretical part of the thesis I focused on the problematic of the taxonomic classification of the Caribbean flamingo and its changes in the course of time, and I also described the order Phoenicopteriformes, family Phoenicopteridae and the Caribbean flamingo. Furthermore, I characterized microsatellites and their occurrence in the avian genome, and finally, I discussed *de novo* and cross-species isolated microsatellites in the Caribbean flamingo and microsatellites derived from species of the order Procellariiformes.

In the experimental part I performed the cross-species PCR amplification of 213 microsatellites, which included all 207 so far known loci isolated from representatives from the order Procellariiformes and 6 cross-species microsatellites polymorphic in the order Procellariiformes isolated from representatives from the order Charadriiformes and Passeriformes, on the genomic DNA of six unrelated individuals of the Caribbean flamingo. All of the tested microsatellites provided monomorphic or polymorphic products. Two out of 52 polymorphic microsatellites were excluded as polymorphic but unscorable and at one microsatellite loci I found two areas of polymorphism. To summarize, I found 50 pairs of primers which amplified 51 polymorphic products in the Caribbean flamingo.

# Obsah

1	Úvod .....	7
2	Cíle práce .....	8
3	Literární přehled .....	9
3.1	Zařazení plameňáků do systému .....	9
3.2	Řád plameňáci .....	12
3.3	Čeleď plameňákovití .....	13
3.3.1	Plameňák karibský .....	14
3.3.1.1	Taxonomické zařazení plameňáka karibského .....	14
3.4	Mikrosatelity .....	15
3.4.1	Rozdělení mikrosatelitů .....	15
3.4.2	Využití mikrosatelitů .....	16
3.4.3	Mutace mikrosatelitů .....	16
3.4.4	Výskyt mikrosatelitů v ptačím genomu .....	17
3.4.5	Mikrosatelity u plameňáků .....	18
3.4.5.1	<i>De novo</i> mikrosatelity známé u plameňáků .....	18
3.4.5.2	<i>Cross-species</i> mikrosatelity známé u plameňáků .....	19
3.4.6	Mikrosatelity u druhů z řádu trubkonosí .....	20
3.4.6.1	Mikrosatelity u druhů z čeledi buňňáčkovití .....	20
3.4.6.2	Mikrosatelity u druhů z čeledi buňňákovití .....	22
3.4.6.3	Mikrosatelity u druhů z čeledi albatrosovití .....	27
4	Materiál a metody .....	30
4.1	Biologický materiál .....	30
4.2	PCR amplifikace mikrosatelitních lokusů .....	30
4.3	Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace .....	34
4.4	Použité chemikálie .....	36
4.5	Použité roztoky .....	37
4.6	Použité laboratorní přístroje .....	39
5	Výsledky .....	40
6	Diskuze .....	52
7	Závěr .....	62
8	Seznam zkratk .....	63
9	Použitá literatura .....	64

# 1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké úseky DNA skládající se z tandemově opakovaných jednotek dlouhých 1–6 párů bazí. Díky variabilitě v délce mikrosatelitních lokusů způsobených mutacemi se z mikrosatelitů staly populární genetické markery, které jsou využity například při studiích genetické struktury populací, testování paternity či při genetickém mapování. Mimo *de novo* izolaci lze mikrosatelity také nalézt pomocí *cross-species* PCR amplifikace, která umožňuje použití primerů pro izolovaný lokus od zdrojového druhu k amplifikaci stejného mikrosatelitního lokusu u druhu fylogeneticky blízce příbuzného.

V této bakalářské práci budou u šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovány všechny mikrosatelity původně izolované od zástupců z řádu trubkonosí a několik mikrosatelitů izolovaných od zástupců z řádu dlouhokřídlí a pěvci, které u trubkonosých vykazovaly polymorfismus. Úkolem bude nalezení polymorfních mikrosatelitních lokusů a jejich charakteristika.



## 2 Cíle práce

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

## 3 Literární přehled

### 3.1 Zařazení plameňáků do systému

Plameňáci (Phoenicopteriformes) jsou podle některých autorů (del Hoyo *et al.*, 1992) jedním z nejstarších řádů ptáků, což dokazují fosilie z období oligocénu staré asi 30 miliónů let, které byly nalezeny i v některých částech Evropy, Austrálie a Severní Ameriky, kde se plameňáci již nevyskytují. Plameňáci byli tedy dříve rozšířeni na větší ploše než dnes (del Hoyo *et al.*, 1992). Moderní studie (Prum *et al.*, 2015) zpochybňují, že plameňáci jsou jednou z nejstarších skupin ptáků, i když podle nejstarší známé nalezené fosilie jednoho z potomků teoretického společného předka plameňáků a potápek, datují jejich divergenci již do období eocénu. Například fosilní nálezy staré asi 58 milionů let dokládají výskyt řádu faetoni (Phaethontiformes) již v období paleocénu. Dále se podle nalezených fosilií v období paleocénu před více než 62 miliony lety od sebe oddělily řád tučňáci (Sphenisciformes) a jejich sesterský řád trubkonosí (Procellariiformes) (Prum *et al.*, 2015).

Taxonomické zařazení plameňáků je problematické a v průběhu let se neustále mění. V některé literatuře se například uvádí, že plameňáci jsou na základě některých anatomických podobností příbuzní s řádem brodiví (Ciconiiformes) (Cracraft, 1981, Šťastný *et al.*, 1998, Veselovský, 2001). Jedním z návrhů bylo zařazení plameňáků jako podřád brodivých (del Hoyo *et al.*, 1992). Chování a hlas plameňáků je na druhou stranu podle některých autorů řadí blíže k řádu vrubozobí (Anseriformes), stejně tak jako jejich nohy opatřené plovací blánou nebo peří uzpůsobené pobytu ve vodě, které poukazují na podobnost s husami (del Hoyo *et al.*, 1992, Šťastný *et al.*, 1998). Přiřazení plameňáků k vrubozobým bylo taktéž podporováno výsledky studie zkoumající strukturu žlučových kyselin, které se používají k určení evolučních vztahů mezi obratlovci. Kvůli podobnostem s oběma řády byla tedy tendence plameňáky řadit do samostatného řádu Phoenicopteriformes, mezi brodivé a vrubozobé (del Hoyo *et al.*, 1992). Na základě podobností v chování a podobné anatomie mezi plameňákem a pisilou australskou (*Cladorhynchus leucocephalus*) bylo také navrženo, aby byli plameňáci zařazeni jako samostatná čeleď v rámci řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) (del Hoyo *et al.*, 1992, Veselovský, 2001).

Při studiu morfologické konvergence a divergence v evoluci vodních ptáků za použití DNA-DNA hybridizace a dat získaných analýzou jaderné a mitochondriální DNA, došlo na základě vyhodnocení získaných výsledků

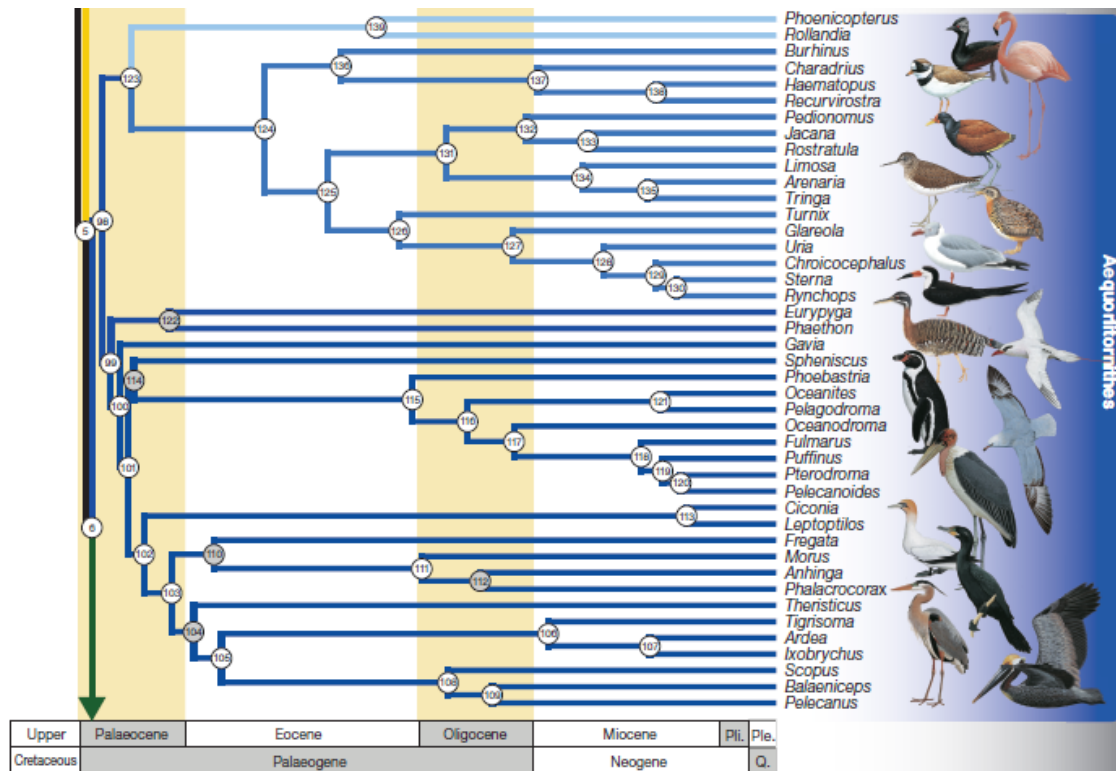
k překvapivému zjištění, že plameňáci a potápky patří do stejné skupiny v rámci vodních ptáků, i když jinak nevykazují morfologickou podobnost, což je pravděpodobně způsobeno právě morfologickou divergencí (Van Tiunen *et al.*, 2001). Tuto hypotézu podporují morfologické, oologické a parazitologické důkazy, které byly získány při detailním morfologickém porovnání plameňáků a potápek, jež nikdy předtím nebylo uskutečněno, a tudíž byly určité podobnosti mezi těmito řády přehlíženy (Mayr, 2004). Diskutabilní přiřazení plameňáků jako sesterské skupiny potápek bylo potvrzeno také fylogenetickou studií ptáků založenou na analýze nukleární DNA, která však ve vzniklém fylogenetickém stromě plameňáky s potápkami nepovažuje za součást kladu vodních ptáků, který zahrnuje členy řádu veslonozí, brodiví, trubkonosí, tučňáci a potáplice (Hackett *et al.*, 2008).

Autoři další studie (Jarvis *et al.*, 2014) zkoumali historii moderních ptáků na základě fylogenetické analýzy celých genomů u 48 druhů ptáků reprezentujících všechny řády Neoaves. Ve fylogenetickém stromě sestaveném na základě získaných molekulárních dat ponechali plameňáky a potápky jako sesterské skupiny, ale taktéž je nepřiradili k ostatním velkým vodním ptákům (brodiví, trubkonosí, potáplice, tučňáci a veslonozí).

Nejnovější fylogenetická analýza založená na sekvenování nové generace (Prum *et al.*, 2015) se svými výsledky od výše zmíněné analýzy (Jarvis *et al.*, 2014) v mnohém liší, zřejmě kvůli rozdílnému počtu vzorků použitých k sestavení fylogenetického stromu a jinému způsobu interpretace získaných dat. Pro studii, kterou zveřejnil Jarvis *et al.* (2014) byly vzorky odebrány pouze od 48 ptačích druhů, kdežto vzorky pro analýzu, kterou provedli Prum *et al.* (2015), byly odebrány od 198 ptačích druhů ze 122 čeledí ve všech 40 existujících řádech ptáků. V rámci monofyletické skupiny Neoaves rozlišují Prum *et al.* (2015) pět hlavních kladů – Strisores, Columbaves, Gruiformes, Aequorlitorornithes a Inopaves. Každý z těchto kladů je sesterskou skupinou ke zbývajícím následujícím kladům Neoaves. Nejnovějším pohledem na systematické zařazení plameňáků, je jejich přiřazení do kladu označovaného jako Aequorlitorornithes, který zahrnuje všechny vodní ptáky s výjimkou vrubozobých (Anseriformes). Plameňáci (Phoenicopteriformes), dlouhokřídli (Charadriiformes) a potápky (Podicipediformes) zde tvoří sesterský klad ke kladu skládajícímu se ze všech ostatních vodních ptáků (Prum *et al.*, 2015).

Dříve, když ještě nebyla dostupná molekulární data, byly vztahy v rámci kladu vodních ptáků těžko rozlišitelné, především kvůli extrémní morfologické divergenci a

nedostatku apomorfních morfologických charakteristik (McCormack *et al.*, 2013). Podle tradičního pojetí dříve řád veslonozí obsahoval fregatkovité, pelikánovité, terejovité, anhingovité, kormoránovité a faetonovité a řád brodiví zahrnoval čápoité, ibisovité, volavkovité, plameňákovité, kladivoušovité a člunozobcovité (Gosler, 1994). Monofylie řádů veslonozí a brodiví však nebyla podpořena žádnou molekulární studií založenou na analýze mitochondriálních a jaderných sekvencí DNA a to, že jsou oba řády polyfyletické, potvrdila i kladistická analýza anatomických charakteristik (Mayr, 2003). Dnes je řád veslonozí rozdělen na tři skupiny – první skupinu tvoří pelikánovití a kladivoušoví s člunozobcovitými, kteří byli dříve řazeni do řádu brodiví. Druhá skupina se skládá z faetonů, ke kterým byli jako sesterské skupiny přiřazeni rovněž slunatci a kagu, kteří byli dříve řazeni do řádu krátkokřídlých. Třetí skupina obsahuje kormoránovité, fregatkovité, terejovité a anhingovité. Taktéž řád brodiví je dnes rozdělen – jednu skupinu tvoří vlastní čápi a nesyti, druhou volavkovití a ibisovití a jak již bylo zmíněno, kladivouši s člunozobci byli přiřazeni k pelikánovitým (viz obrázek č. 1, Prum *et al.*, 2015). Otázkou je, zda do budoucna nebudou i volavkovití a ibisovití rozděleni na dvě samostatné skupiny. Tučňáci jsou dnes podle výsledků fylogenetických analýz založených na molekulárních datech i přes morfologické odlišnosti řazeni jako sesterská skupina trubkonosých (Hackett *et al.*, 2008, McCormack *et al.*, 2013, Prum *et al.*, 2015).



**Obrázek č. 1:** Výsek z kladogramu ptáků obsahující klad Aequirornithes. (Prum *et al.*, 2015)

### 3.2 Řád plameňáci

Plameňáci (Phoenicopteriformes) jsou vodní ptáci vysokí asi 80–145 cm. Jejich typickým znakem jsou dlouhé nohy a krk, zahnutý zobák a peří s charakteristickým růžovým zbarvením. Tělo plameňáků je oválné s malou hlavou na protáhlém krku. Hlava je opatřena mohutným zobákem, pomocí kterého filtrují vodu a získávají z ní potravu. Okraje čelistí obsahují lamely (rohovité útvary) uspořádané do řad (del Hoyo *et al.*, 1992, Gaisler *et Zima*, 2007). Rohovité lamely jsou pokryty jemnými vlásky, které mohou být podle potřeby ve vztyčené nebo ležící poloze. Velký jazyk vyplňuje mezeru mezi čelistmi a plameňáci jej používají jako píst. Opakovaně pumpují vodu s bahnem dovnitř a ven ze zobáku, přičemž ji filtrují přes vnitřní lamely, které zachytávají řasy, rozsivky, vodní bezobratlé a další potravu. Zobáky se u jednotlivých druhů plameňáků liší tvarem a také uspořádáním a počtem lamel s vlásky. Uzpůsobení zobáků k lovu různé potravu vylučuje mezidruhovou konkurenci při případném soužití těchto druhů ve stejném prostředí (del Hoyo *et al.*, 1992). Tělo plameňáků je pokryto růžovým peřím s černými letkami. Růžové zbarvení je zajištěno karotenoidními pigmenty. Plameňáci je získávají konzumací řas, které tyto pigmenty produkují, nebo vodních bezobratlých živočichů žijících se těmito řasami. Dlouhý krk plameňáků je tvořen 17 krčními obratli, které jsou prodloužené a

vytvářejí typický stupňovitý vzhled při ohnutí krku (del Hoyo *et al.*, 1992). Dlouhé nohy bez opeření umožňují plameňákům brodění ve větších hloubkách. Při chůzi v mělčinách, ale i při plavání jim napomáhá kožovitá plovací blána mezi třemi předními prsty (Gaisler *et Zima*, 2007). Za letu se jejich rychlost blíží až k 60 km/h (del Hoyo *et al.*, 1992).

Kromě Austrálie a Antarktidy obývají plameňáci všechny kontinenty. Tito ptáci vytvářejí velká hejna, která mohou dosahovat až několik desítek tisíců ptáků. Hejna setrvávají ve slaných, brakických nebo i alkalických vodách s pH až 10,5. Obývají mělké laguny, jezera a mořské zátoky. (del Hoyo *et al.*, 1992)

Z peří, bláta a vegetace si stavějí hnízda kuželovitého tvaru, vysoká asi 30 cm (del Hoyo *et al.*, 1992, Gaisler *et Zima*, 2007). Na skalnatých ostrovech, kde není bahno, používají ke stavbě hnízd kamení a suť. Samice kladou jedno, ojediněle dvě vejce. Vejce je poměrně velké, velikost se u jednotlivých druhů liší. Obecně vejce váží v rozmezí 115–140 g. Inkubace trvá 27–31 dní a při zahřívání vejce se střídají oba rodiče. Vylíhlé mládě má rovný zobák a šedé prachové peří. Toto peří je asi ve 4 týdnech věku nahrazeno druhým prachovým peřím, které je tmavší barvy. V hnízdě mládě setrvává 5 až 12 dní, poté hnízdo opustí a připojí se k ostatním mláďatům, která formují velké jesle čítající tisíce ptáků (del Hoyo *et al.*, 1992). O skupinu mláďat se stará několik dospělých. Rodiče krmí svá mláďata mléku podobnou tekutinou (Gosler, 1994, Veselovský, 2001), jejíž sekrece je zajištěna horní částí zažívacího traktu a regulována hormonem prolaktinem (del Hoyo *et al.*, 1992). Schopnost produkovat výživný sekret mají obě pohlaví a krmí jím mláďata v hnízdě i v jeslích, kde své mládě rozpoznají podle hlasu (del Hoyo *et al.*, 1992).

### 3.3 Čeled' plameňákovití

Řád plameňáci obsahuje pouze jednu čeled' – plameňákovití (Phoenicopteridae). V rámci této čeledi se rozlišují tři rody: *Phoenicopus*, *Phoeniconaias* a *Phoenicoparrus*, přičemž česky jsou všechny tři rody označovány jako plameňáci, které zahrnují pět druhů (del Hoyo *et al.*, 1992). V rozlišení druhů v rámci rodu *Phoenicopus* se autoři rozcházejí. Většina do rodu *Phoenicopus* řadí plameňáka růžového (*P. ruber*) a plameňáka chilského (*P. chilensis*) (del Hoyo *et al.*, 1992, Šťastný *et al.*, 1998, Veselovský, 2001). Podle del Hoyo *et al.* (1992) se druh plameňák růžový dělí na dva poddruhy – plameňáka růžového (*Phoenicopus ruber roseus*) a plameňáka karibského (*Phoenicopus ruber ruber*), přičemž se tyto dva poddruhy liší svým geografickým rozšířením. Někteří autoři naopak přiřazují český ekvivalent plameňák růžový

k latinskému názvu *P. roseus* (Gaisler *et* Zima, 2007). Já v této bakalářské práci považuji plameňáka karibského (*P. ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*) za dva samostatné druhy, stejně jako Torres *et al.* (2014). Rod *Phoenicopterus* se oproti zbývajícím rodům čeledi plameňákovití vyznačuje primitivnější stavbou zobáku. Rod *Phoeniconaias* se svým jediným zástupcem plameňákem malým (*P. minor*) a rod *Phoenicoparrus* zahrnující plameňáka andského (*P. andinus*) a plameňáka Jamesova (*P. jamesi*) tvoří skupinu se specializovanější strukturou zobáku. (del Hoyo *et al.*, 1992)

### 3.3.1 Plameňák karibský

Plameňák karibský (*Phoenicopterus ruber*) je největší plameňák vysoký 120–145 cm, s rozpětím křídel 140–165 cm. Jeho hmotnost se pohybuje okolo 2100–4100 g. Samice mají oproti samcům kratší nohy a menší tělo. (del Hoyo *et al.*, 1992)

Vyskytuje se na Galapágách a v Karibiku. Tvoří velké kolonie, ve kterých žije až 20 000 párů. Populace plameňáka karibského na Galapágách je někdy považována za poddruh označovaný *Phoenicopterus ruber glyphorhynchus*. Odlišuje se od ostatních populací plameňáků tvorbou malých kolonií čítajících 3–50 párů. Jedinci žijící na Galapágách se od ostatních plameňáků liší také svým zbarvením a velikostí. (del Hoyo *et al.*, 1992)

Strava plameňáka karibského je různorodá a skládá se z živočišné a rostlinné složky. Živočišnou složku potravy tvoří vodní bezobratlí, jako jsou korýši, měkkýši, kroužkovci a larvy hmyzu. Příležitostně může požít také vodní brouky, mravence, kraby nebo malé ryby. Rostlinnou složkou potravy jsou semena a výhonky bahenních rostlin. Potravu přijímá za chůze. (del Hoyo *et al.*, 1992)

#### 3.3.1.1 Taxonomické zařazení plameňáka karibského

Zařazení plameňáka karibského do systému (Meziani, 2011):

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

### 3.4 Mikrosatelity

Mikrosatelity, které se také označují jako STRs (Short Tandem Repeats) nebo SSRs (Simple Sequence Repeats), jsou krátké úseky DNA skládající se z tandemově opakovaných jednotek o délce 1–6 párů bází (Primmer *et al.*, 1997, Schlötterer, 2000). Někteří autoři uvádějí délku repetitivních jednotek i méně než 5 párů bází (Bruford *et Wayne*, 1993) nebo 1–10 párů bází (Baker, 2000). Mikrosatelity se nacházejí ve všech eukaryotních a prokaryotních genomech, jak v proteiny kódujících, tak i v nekódujících oblastech DNA (Tóth *et al.*, 2000). Mikrosatelity jsou hypervariabilní ve své délce (Tautz, 1989), díky čemuž jsou vysoce polymorfní (Bruford *et Wayne*, 1993). Mikrosatelitní alely se dají nepřímo pozorovat po PCR amplifikaci a následném rozdělení PCR produktu pomocí elektroforézy (Chapuis *et Estoup*, 2007).

#### 3.4.1 Rozdělení mikrosatelitů

Podle délky repetitivní jednotky lze mikrosatelity dělit na mono-, di-, tri- až dekanukleotidové (Baker, 2000). Obecně, se ve všech taxonech častěji vyskytují poly(A) a poly(T) mononukleotidové repetice, než sekvence poly(C) a poly(G). Dinukleotidové repetice se zřídka vyskytují v exonech a jsou hojné především v intronech a intergenových oblastech DNA, stejně tak jako repetice tetranukleotidové. Nejčastějším dinukleotidovým repetitivním motivem u všech obratlovců a členovců je AC. Pentanukleotidové repetice jsou taktéž málo zastoupeny v exonech všech taxonů. V exonech se nejčastěji vyskytují repetice trinukleotidové a hexanukleotidové. Trinukleotidové repetice hrají důležitou roli v mnoha lidských neurodegenerativních poruchách, jako jsou například syndrom fragilního X chromozomu a Huntingtonova choroba (Tóth *et al.*, 2000).

Mikrosatelity se také mohou dělit podle typu repetitivní sekvence na dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené (Oliveira *et al.*, 2006). Repetitivní sekvence dokonalého mikrosatelitu není narušena a opakuje se v ní pouze základní motiv, do sekvence nedokonalého mikrosatelitu je vložen pár bází, které neodpovídají sekvenci opakujícího se motivu (Baker, 2000, Oliveira *et al.*, 2006). Přerušovaný mikrosatelit kromě repetitivní sekvence, kterou je tvořený, obsahuje také krátkou sekvenci, která neodpovídá základnímu motivu (Oliveira *et al.*, 2006). Složené mikrosatelity obsahují dva odlišné repetitivní motivy, které spolu sousedí (Baker, 2000, Oliveira *et al.*, 2006).



### 3.4.2 Využití mikrosatelitů

Využití mikrosatelitů v biologii se výrazně rozšířilo po té, co byla zavedena polymerázová řetězová reakce (PCR) (Schlötterer, 2000). SSRs jsou ohraničené jedinečnými úseky DNA, pro které je možné navrhnout primery a pomocí PCR po té amplifikovat specifický mikrosatelitní lokus (Tautz, 1989). Ačkoliv primery navržené pro mikrosatelity nemohou být použity univerzálně, je možné provést tzv. *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitu, mezi blízce příbuznými druhy (Moore *et al.*, 1991). Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů je přímo závislá na evoluční divergenci mezi druhem, od kterého byl mikrosatelitní lokus izolován a druhem, na který bude daný lokus aplikován (Primmer *et al.*, 1996). Jinými slovy, čím jsou si dva druhy fylogeneticky příbuznější, tím je větší pravděpodobnost, že izolovaný mikrosatelit od jednoho druhu bude amplifikován u druhého druhu. Snížení annealingové teploty PCR však může zvýšit šanci úspěšné *cross-species* PCR amplifikace, nezávisle na genetické vzdálenosti mezi druhem, který slouží jako zdroj mikrosatelitu a cílovým druhem (Primmer *et al.*, 2005). Změna (způsobená mutací) v nukleotidové sekvenci jedinečného úseku DNA, který ohraničuje mikrosatelitní lokus, může zabránit nasednutí vybraného primeru na templátovou DNA během amplifikace mikrosatelitního lokusu pomocí PCR, což má za následek vznik nulové alely (Chapuis *et Estoup*, 2007). Výskyt nulové alely může způsobit značné problémy zejména při studiu rodičovství, kde jsou mikrosatelitní markery hojně využívány (Dakin *et Avise*, 2004).

Mikrosatelity jsou už dvě desítky let jedny z nejpopulárnějších genetických markerů (Schlötterer, 2000). Široké uplatnění mikrosatelitů, které se vyskytují ve velkém počtu alel, je umožněno díky jejich kodominanci a vysoké variabilitě. Homozygotní mikrosatelitní lokus se vyznačuje stejným počtem repeticí na obou homologních chromozomech, kdežto heterozygotní mikrosatelitní lokus se liší počtem repeticí pro každou alelu – například jedna alela obsahuje 9 repeticí, druhá alela 10. V populaci se většinou vyskytuje několik alel s různým počtem repeticí, čehož je využito v populační genetice a forezních vědách (Oliveira *et al.*, 2006).

### 3.4.3 Mutace mikrosatelitů

Faktorem limitujícím informativnost mikrosatelitu pro stanovení genetické příbuznosti při použití standardní genotypizace je to, že určitý typ alely – například alely se stejnou velikostí, může obsahovat nejen alely od identického předka, ale také alely stejné délky, které vznikly konvergencí, což je nevyhnutelný následek mutačního procesu

(Primmer *et al.*, 1998). Stav, kdy mají dva mikrosatelitní lokusy bez stejného předka identickou délku se označuje homoplazie (Estoup *et al.*, 2002).

Hlavním mechanismem způsobujícím mutace mikrosatelitů je s největší pravděpodobností DNA *slippage*, který bývá v literatuře označován i jako *slipped-strand mispairing* (SSM) (Levinson *et Gutman*, 1987, Klintschar *et al.*, 2004). DNA *slippage* je proces, díky kterému se v průběhu replikace může změnit počet repetitivních jednotek mikrosatelitu (Levinson *et Gutman*, 1987, Tachida *et Iizuka*, 1992). Druhým mechanismem podílejícím se menší mírou na vysoké mutační rychlosti mikrosatelitů, která se pohybuje mezi  $10^{-2}$ – $10^{-4}$  na lokus a generaci, je rekombinace (Harding *et al.*, 1992). Rekombinace může potencionálně změnit délku SSR nerovnoměrným *crossing-overem* nebo genovou konverzí (Brohede *et Ellegren*, 1999, Li *et al.*, 2002).

Mezi potencionální faktory ovlivňující četnost mutací mikrosatelitu patří například počet repeticí, sekvence repetičního motivu, délka repetitivní jednotky nebo četnost rekombinace (Schlötterer, 2000). Neff *et Gross* (2001) zaznamenali pozitivní korelaci mezi délkou (počtem repeticí na mikrosatelitním lokusu) a počtem alel mikrosatelitu, a to napříč všemi 5 studovanými třídami obratlovců (ryby, plazi, obojživelníci, ptáci a savci).

#### **3.4.4 Výskyt mikrosatelitů v ptačím genomu**

V ptačím genomu se mikrosatelity vyskytují méně často, než je tomu u ostatních obratlovců a na rozdíl od mikrosatelitů vyskytujících se u savců, se ptačí mikrosatelity nejvíce jako asociované s krátkými rozptýlenými jadernými elementy (SINEs) (Primmer *et al.*, 1997). Nabízelo se vysvětlení, že menší počet mikrosatelitních lokusů u ptáků je způsoben redukcí velikosti jejich genomu, což vedlo k menšímu poměru nekódující DNA, kde se mikrosatelitní lokusy hojně vyskytují (Primmer *et al.*, 1997). Neff *et Gross* (2001) však myšlenku, že počet mikrosatelitů závisí na velikosti genomu, kterou prezentoval Primmer *et al.* (1997), vyvrátili. Možným vysvětlením nižší frekvence výskytu mikrosatelitů v ptačím genomu je to, že ptáci ve svém genomu mají nedostatek evolučních prekurzorů mikrosatelitů, kterými jsou SINEs a LINEs (dlouhé rozptýlené jaderné elementy) a na rozdíl od savců, doposud charakterizované rozptýlené jaderné elementy u ptáků nemají poly(A) zakončení (Chen *et al.*, 1991), které poskytuje zdroj pro vytvoření rozdílných typů repeticí (Primmer *et al.*, 1997, Neff *et Gross*, 2001).

### 3.4.5 Mikrosatelity u plameňáků

Jak již bylo zmíněno dříve, v rámci čeledi plameňákovití rozlišujeme tři rody: *Phoenicopterus*, *Phoeniconaias* a *Phoenicoparrus*, které zahrnují 5 druhů. Část známých mikrosatelitů u plameňáků byla izolována *de novo* a některé mikrosatelity byly nalezeny pomocí *cross-species* PCR amplifikace. *De novo* bylo u plameňáků doposud izolováno dohromady 67 mikrosatelitů, z čehož 61 bylo izolováno a popsáno u rodu *Phoenicopterus* a zbylých 6 u rodu *Phoeniconaias*. U rodu *Phoenicoparrus* zatím nebyly popsány žádné mikrosatelitní lokusy.

#### 3.4.5.1 *De novo* mikrosatelity známé u plameňáků

Izolaci mikrosatelitních lokusů u zástupců rodu *Phoenicopterus* se jako první věnovali autoři dvou disertačních prací, ve kterých byly popsány lokusy Pru $\mu$ 1–Pru $\mu$ 6 (Kapil, 2005) a Pru $\mu$ 7–Pru $\mu$ 13 (Preston, 2005). Drobek (2010) však ve své diplomové práci uvádí, že na základě bioinformatického studia mikrosatelitních lokusů Pru $\mu$ 1–Pru $\mu$ 13 a následného *cross-species* testování 10 z 13 mikrosatelitů popsanych v těchto dvou disertačních pracích a jejich genotypizace došel k závěru, že primery navržené pro lokusy Pru $\mu$ 7–Pru $\mu$ 12 amplifikují jeden a ten samý mikrosatelitní lokus. Z toho vyplývá, že dohromady bylo v těchto dvou disertačních pracích (Kapil, 2005, Preston, 2005) popsáno pouze 8 unikátních mikrosatelitních lokusů. Kapil *et al.* (2010) do své publikace zahrnuli 9 párů primerů navržených pro lokusy Pru $\mu$ 1–Pru $\mu$ 9, avšak článek nebyl zveřejněn a jejich výsledky byly publikovány pouze v elektronické databázi časopisu Molecular Ecology Resources společně s výsledky dalších autorů (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.*, 2010a).

Mikrosatelitní lokusy Pru $\mu$ 1 a Pru $\mu$ 2 (Kapil, 2005) využili Frias-Soler *et al.* (2014) k prokázání genetické divergence členů galapážské populace plameňáka karibského spolu s dalšími třemi mikrosatelity PhoeniE37, PhoeniE104 a PhoeniE66, které převzali z diplomové práce Bauer (2007). Tato diplomová práce však není dostupná v elektronické podobě a pro potřeby Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky na PřF Univerzity Palackého v Olomouci se podařilo získat pouze tabulku 14 mikrosatelitních lokusů (včetně tří výše zmíněných publikovaných mikrosatelitních lokusů), které v rámci své diplomové práce Bauer popsal. Tři z těchto 14 lokusů označil Bauer za monomorfní, 5 za polymorfní a u zbývajících šesti předpokládá polymorfismus a navrhuje jejich další testování.

Dále se popisu mikrosatelitů u rodu *Phoenicopterus* věnovali Geraci *et al.* (2010), kteří izolovali a charakterizovali 37 polymorfních mikrosatelitů u plameňáka růžového (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.*, 2010b).

U plameňáka malého, patřícího do rodu *Phoeniconaias*, bylo ze dvou afrických populací (jižní a východní) *de novo* izolováno 6 mikrosatelitů, přičemž počet detekovaných alel u těchto mikrosatelitních lokusů se pohyboval od 4 do 13 na lokus. Dohromady bylo pro tyto mikrosatelity identifikováno 49 alel. (Zaccara *et al.*, 2011)

### 3.4.5.2 *Cross-species* mikrosatelity známé u plameňáků

*Cross-species* PCR amplifikací mikrosatelitů u plameňáků se zabývali Nádvorník *et al.* (2008). Pro plameňáka karibského bylo pomocí *cross-species* PCR amplifikace za použití primerů amplifikujících polymorfní mikrosatelitní lokusy u druhů z řádu veslonozí (kormorán velký a kormorán galapážský), brodiví (volavka velká, nesyt americký, ibis rudý a kolpík růžový) a potápky (potápka rudokrká) nalezeno 10 polymorfních mikrosatelitů. Celkové množství testovaných mikrosatelitů bylo 70. Z 15 testovaných mikrosatelitů izolovaných od druhů z řádu veslonozí byly u plameňáka karibského polymorfní 2 *cross-species* mikrosatelity: PcD 6 (Piertney *et al.*, 1998) a PhG8 (Duffie *et al.*, 2008), ze 48 mikrosatelitů popsanych u druhů z řádu brodiví bylo polymorfních 8 *cross-species* mikrosatelitů: WS $\mu$  03, WS $\mu$  17, WS $\mu$  20 (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2013), WS2 (van den Bussche *et al.*, 1999), Eru03, Eru11 (Santos *et al.*, 2006), Aaju4 (Sawyer *et Benjamin*, 2006) a Ah 630 (McGuire *et Noor*, 2002) a ze 7 testovaných polymorfních mikrosatelitů nalezených u zástupce z řádu potápky, nebyl u plameňáka karibského úspěšně amplifikován žádný mikrosatelit. U plameňáka růžového bylo stejným způsobem nalezeno 7 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Tři z nalezených polymorfních *cross-species* mikrosatelitů: WS $\mu$  17, PcD 6 a Ah 630, poskytly polymorfní produkt jak u plameňáka karibského, tak u plameňáka růžového. (Nádvorník *et al.*, 2008)

Dále bylo v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky na PřF Univerzity Palackého v Olomouci pomocí primerů navržených pro mikrosatelitní lokusy izolované u druhů z řádu brodiví, veslonozí, plameňáci, dlouhokřídlí, potápky a potáplice nalezeno 73 *cross-species* mikrosatelitů pro plameňáka karibského a 39 *cross-species* mikrosatelitů pro plameňáka růžového, což i se 37 *de novo* mikrosatelity publikovanými pro tento druh (Geraci *et al.*, 2007) činí dohromady 76 polymorfních

lokusů. (Drobek, 2010, Manišová, 2011, Matošková, 2011, Buržáková, 2013, Málková, 2013).

### 3.4.6 Mikrosatelity u druhů z řádu trubkonosí

Řád trubkonosí (Procellariiformes) je v současnosti zařazen do kladu Aequirornithes, který obsahuje všechny vodní ptáky až na vrubozobé (Prum *et al.*, 2015). U ptáků z řádu trubkonosí bylo *de novo* popsáno 207 mikrosatelitů u tří čeledí: nejvíce mikrosatelitů (100) bylo doposud nalezeno u zástupců čeledi buňňákovití (Procellariidae), u zástupců čeledi albatrosovití (Diomedidae) bylo izolováno 53 mikrosatelitů a u zástupců čeledi buňňáčkovití (Hydrobatidae) pak 54. Pro zástupce čeledi buňňíkovití (Pelecanoididae) nebyl doposud popsán žádný mikrosatelit.

#### 3.4.6.1 Mikrosatelity u druhů z čeledi buňňáčkovití

V rámci čeledi buňňáčkovití bylo *de novo* izolováno a popsáno 54 mikrosatelitních lokusů. Tyto mikrosatelity byly izolovány od buňňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*), dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*) a Monteirova (*O. monteiroi*).

Primery pro 10 mikrosatelitních lokusů u dvou druhů buňňáčků, **buňňáčka madeirského a dlouhokřídlého**, navrhli Sun *et al.* (2009). Genomická knihovna byla zkonstruována z DNA získané ze zmrazených vzorků krve od 7 jedinců buňňáčka madeirského (Friesen *et al.*, 2007) pomocí klonování (Glenn *et Schable*, 2005). Z knihovny obsahující 96 na repeticce obohacených klonů bylo 53 klonů sekvenováno. Čtyřicet šest z nich obsahovalo mikrosatelity a devět z nich mělo devět a více repeticí a vhodnou sekvenci jedinečných úseků DNA ohraničujících mikrosatelitní lokus pro navržení primerů. Primery byly navrženy pomocí Primer 3 softwaru (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Genomická knihovna byla taktéž sestavena z DNA ze zmrazených vzorků tkáně dvou jedinců buňňáčka dlouhokřídlého. Z 21 klonů, které byly sekvenovány, pouze dva splňovaly požadovaná kritéria a byly pro ně navrženy primery, avšak pouze jeden z mikrosatelitů byl amplifikován. Variabilita mikrosatelitů byla testována na 27 vzorcích DNA získaných z krve buňňáčka madeirského, 22 vzorcích DNA buňňáčka Monteirova a 24 vzorcích DNA od buňňáčka dlouhokřídlého. U buňňáčka madeirského i Monteirova bylo z 10 amplifikovaných lokusů: Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B a O110-39, 9 polymorfních. U buňňáčka dlouhokřídlého se neamplifikovaly 2 lokusy, 2 poskytly monomorfní produkt a zbylých 6 bylo polymorfních. Tyto lokusy byly také testovány na *cross-species* PCR amplifikaci u buňňáčka galapážského (*O. tethys*) a buňňáčka kroužkového (*O. hornbyi*) taktéž z čeledi

buňňáčkovití a buňňáka havajského (*Pterodroma phaenopygia*) z čeledi buňňákovití. U těchto tří druhů byly získány produkty *cross-species* PCR amplifikace všech mikrosatelitních lokusů až na Oc64B a Oc79-2. U buňňáka havajského byly téměř všechny amplifikované mikrosatelity (mimo lokus Oc49) polymorfnní, přičemž počet alel autoři neuvádějí.

Bicknell *et al.* (2011) charakterizovali set 37 mikrosatelitních markerů vhodných pro populační či paternitní studie u **buňňáčka dlouhokřídleho**. Nově izolovali a popsali 26 polymorfnních mikrosatelitů (Ole01–Ole26). Z krve jedinců buňňáčka dlouhokřídleho byla pomocí precipitační metody za použití octanu amonného extrahována genomická DNA. Genomická knihovna byla obohacena o repetitivní sekvence. Transformované kolonie byly sekvenovány a poté bylo izolováno 211 nových unikátních mikrosatelitních sekvencí pro buňňáčka dlouhokřídleho. Za použití Primer 3 softwaru (Rozen *et Skaletsky*, 2000) byl navržen set primerů pro 50 unikátních mikrosatelitních sekvencí. Při hledání polymorfnních mikrosatelitů u buňňáčka dlouhokřídleho byly použity i již existující mikrosatelity: 7 mikrosatelitních lokusů izolovaných u jiných druhů patřících do čeledi buňňáčkovití (Sun *et al.*, 2009) a 47 mikrosatelitů zahrnující mikrosatelity s vysokou *cross-species* přenositelností (Dawson *et al.*, 2010) včetně mikrosatelitů izolovaných u sovy pálené (*Tyto alba*) (Klein *et al.*, 2009). Tyto existující mikrosatelitní lokusy byly společně s novými testovány na polymorfismus na 4–6 nepříbuzných jedincích. Ze 47 již existujících lokusů bylo 15 polymorfnních a z 50 nových mikrosatelitů izolovaných u buňňáčka dlouhokřídleho bylo polymorfnních 26 mikrosatelitních lokusů. Těchto celkem 41 polymorfnních lokusů bylo dále testováno na 24 nepříbuzných jedincích (14 samcích a 10 samicích) a bylo detekováno 2–22 alel na lokus. Tři z lokusů se ukázaly jako vázané na chromozom Z.

U **buňňáčka Monteirova** Bried *et al.* (2012) nově popsali 18 polymorfnních mikrosatelitů. Ptačí DNA byla izolována z krve jedinců za použití QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelity byly poté izolovány z obohacené knihovny a pyrosekvenovány podle Malausa *et al.* (2011) a Meglécz *et al.* (2010). Ze sekvencí, které se svou velikostí pohybovaly v rozmezí 80–469 bází a zároveň obsahovaly mikrosatelitní motiv delší než 5 repeticí, bylo vybráno 27 lokusů s nejvyšším počtem nepřerušovaných repeticí. Z nich bylo po analýze pro další práci zachováno pouze 18 lokusů: Omn1–Omn4, Omn6–Omn8, Omn11, Omn14–Omn17, Omn21–Omn25 a Omn28. Variabilita těchto lokusů byla testována na 125 dospělých jedincích buňňáčka Monteirova. Počet alel na lokus se pohyboval od 4 do 17. Primery navržené pro těchto 18 mikrosatelitů byly také použity

pro *cross-species* PCR amplifikaci u dalších tří druhů z řádu trubkonosí. *Cross-species* PCR amplifikace byla nejúspěšnější u nejpříbuznějšího druhu, buňáčka madeirského, který patří do čeledi buňáčkovití, stejně tak jako buňáček Monteirův a byly u něj amplifikovány všechny testované lokusy, z čehož bylo 17 polymorfních se 2–6 alelami. U dalších dvou testovaných druhů, buňáka Bulwerova a modravého, kteří patří do čeledi buňáčkovití, měla *cross-species* PCR amplifikace menší úspěšnost. U buňáka Bulwerova bylo amplifikováno 7 lokusů, z toho byly 3 polymorfní se 2 alelami a u buňáka modravého bylo amplifikováno 6 lokusů, z čehož byly 2 polymorfní se 3 a 6 alelami.

#### 3.4.6.2 Mikrosatelity u druhů z čeledi buňáčkovití

V rámci čeledi buňáčkovití bylo popsáno a *de novo* izolováno 100 mikrosatelitních lokusů, a to od buňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), šedého (*Calonectris diomedea*), taiko (*Pterodroma magentae*), baleárského (*Puffinus mauretanicus*), trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*), Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), havajského (*Pterodroma sandwichensis*), útlozobého (*Pachyptila belcheri*) a světlonohého (*Puffinus carneipes*).

Techow *et* O’Ryan (2004) izolovali a charakterizovali 6 polymorfních dinukleotidových mikrosatelitů u **buňáka bělobradého**. Z tkáně, která byla odebrána 5 jedincům buňáka bělobradého, byla získána DNA digescí proteinázou K a následnou fenol-chloroformovou extrakcí a srážením ethanolem. Ke konstrukci obohacené genomové knihovny byla použita PCR amplifikace s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP-PCR). Z 21 sekvenovaných rekombinantních plazmidů, 17 obsahovalo mikrosatelity. Pro 10 mikrosatelitů s vhodnou unikátní oblastí DNA ohraničující mikrosatelit byly navrženy primery za použití softwaru DNAMAN verze 4.13 (Lynnon BioSoft). Šest z mikrosatelitních lokusů: Paequ2, Paequ3, Paequ7, Paequ8, Paequ10 a Paequ13, se ukázalo u buňáka bělobradého jako polymorfní. Počet alel na lokus se pohyboval od 3 do 9. Primery navržené pro mikrosatelity u buňáka bělobradého byly také použity pro *cross-species* PCR amplifikaci u dalších šesti druhů z řádu trubkonosí, a to u tří druhů z čeledi buňáčkovití: buňáka tristanského (*Procellaria conspicillata*), obrovského (*Macronectes giganteus*) a Hallova (*M. halli*) a u tří druhů z čeledi albatrosovití: albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), šedohlavého (*Thalassarche chrysostoma*) a černobrého (*T. melanophris*). Nejvíce polymorfních mikrosatelitů (7) bylo získáno u buňáka tristanského, naopak nejméně u albatrosa

stěhovavého, kde byl polymorfní pouze lokus Paequ2. U ostatních druhů se počet polymorfních mikrosatelitů pohyboval od 3 do 5, přičemž počet alel autoři neuvádějí.

U **buřňáka šedého** popsali Bried *et al.* (2008) 11 polymorfních dinukleotidových mikrosatelitů Cd1–Cd11. DNA byla extrahována ze vzorků ptačí krve pomocí QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelity byly izolovány z obohacené knihovny za použití biotinem značených mikrosatelitních sond, magnetických kuliček potažených streptavidinem a XL10 Gold kompetentních bakterií (Stratagene). Z rekombinantních klonů bylo vybráno 262 pozitivních klonů a ty byly sekvenovány. Pro další PCR amplifikaci bylo vybráno 15 mikrosatelitů s největším počtem nepřerušovaných repeticí. Tyto mikrosatelity byly testovány na 43 jedincích buřňáka šedého. Jedenáct z 15 mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních a bylo u nich detekováno 2–8 alel na lokus. Lokus Cd4 se ukázal jako vázaný na chromozom Z, jelikož žádná z 23 testovaných samic pro tento lokus nebyla heterozygotní. S 11 páry primerů navržených pro polymorfní mikrosatelity u buřňáka šedohlavého byla provedena *cross-species* PCR amplifikace u dalších tří druhů z řádu trubkonosí. Dva ze tří druhů, které byly k testování použité, jsou klasifikovány jako celosvětově ohrožené: albatros stěhovavý z čeledi albatrosovití a buřňák bělobradý z čeledi buřňákovití a třetí druh buřňák Bulwerův, taktéž z čeledi buřňákovití, je považován za ohroženého v Evropě. Nejvíce polymorfních mikrosatelitů bylo amplifikováno u buřňáka Bulwerova, kde z 10 amplifikovaných lokusů bylo 8 polymorfních. U buřňáka bělobradého se amplifikovalo 7 mikrosatelitů a z toho byly dva polymorfní: Cd2 a Cd9. U albatrosa stěhovavého se z 11 lokusů amplifikovalo pouze 5, z čehož byl polymorfní pouze lokus Cd1.

Lawrence (2008) popsala dva polymorfní mikrosatelitní lokusy Tch6 a Tch25 u **buřňáka taiko**. Od 145 jedinců byly odebrány vzorky krve a peří, z nichž byla extrahována DNA. Mikrosatelity byly poté izolovány ze sestavené genomické knihovny obohacené o repetice. Pozitivní klony obsahující mikrosatelity byly sekvenovány a pro devět mikrosatelitových sekvencí byly navrženy primery pomocí programu Primer 3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Po otestování variability těchto mikrosatelitů pro další analýzu zbyly pouze dva polymorfní mikrosatelitní lokusy: Tch6 s dvěma alelami a Tch25 se čtyřmi alelami. U buřňáka taiko bylo také na *cross-species* PCR amplifikaci testováno 22 mikrosatelitů izolovaných u jiných druhů z řádu trubkonosí a dlouhokřídlí. Šest z těchto testovaných mikrosatelitů bylo u buřňáka taiko polymorfních se 2–9 alelami na lokus: Paequ3, Paequ8 a Paequ 13 izolované od buřňáka bělobradého z čeledi buřňákovití (Techow *et O’Ryan*, 2004), De33 od albatrosa stěhovavého z čeledi



albatrosovití (Burg, 1999) a také RBG18 a RBG29, které byly izolované od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) z řádu dlouhokřídlí (Given *et al.*, 2002).

Deset nových polymorfních mikrosatelitů u kriticky ohroženého **buřňáka baleárského** izolovali Gonzales *et al.* (2009). Genomická DNA byla extrahována za použití fenol-chloroformové metody, naštípána restričními enzymy *RsaI* a *XmnI* a fragmenty byly následně ligovány do univerzálních SNX linkerů a DNA byla amplifikována. Fragmenty byly obohaceny o CA/AAAG repetice a po další amplifikaci byla obohacená DNA ligována do pGEM-T Easy vektoru (Promega). Následovala transformace do ultrakompetentní *E. coli*. Sto osm klonů obsahovalo mikrosatelity a dvacet tři z nich bylo vybráno pro návržení primerů pomocí Primer 3 softwaru (Rozen *et Skaletsky*, 2000) a z toho bylo 19 úspěšně optimalizováno. Variabilita těchto lokusů byla testována na 55 jedincích buřňáka baleárského a bylo zjištěno, že pouze 10 mikrosatelitů je polymorfních: Puff 1.5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2C, Puff G2F, Puff G11F, Puff PM2 a Puff Sma6. Jeden z těchto 10 mikrosatelitů, Puff Sma6, byl prokázán jako vázaný na chromozom W, čemuž napovídalo i to, že byl amplifikovaný pouze u samic. Zaznamenaný počet alel na lokus byl 2–10.

Brown *et Jordan* (2009) izolovali 6 mikrosatelitních lokusů (Parm01–Parm06) u **buřňáka trinidadského**. Genomická DNA byla získána ze vzorků tkání tří mrtvých mláďat buřňáka trinidadského fenol-chloroformovou extrakcí. Byla zkonstruována obohacená genomová knihovna, pozitivní klony byly screenovány a plazmidy obsahující mikrosatelity byly poté sekvenovány za použití M13 *forward* a *reverse* primerů a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems). Primery pro mikrosatelitní lokusy byly navrženy pomocí Primer 3 softwaru (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Ze 43 testovaných párů primerů pouze 6 párů u buřňáka trinidadského amplifikovalo produkt. Polymorfní byly tři lokusy, u kterých bylo detekováno 4–10 alel, zbylé tři byly monomorfní, ale ukázaly se jako polymorfní u několika dalších testovaných druhů. Všech šest mikrosatelitů bylo testováno *cross-species* PCR amplifikací na 17 druzích z řádu trubkonosí a 1 druhu tučňáka. Lokusy Parm01 a Parm02 se amplifikovaly u všech 18 testovaných druhů, ostatní lokusy se amplifikovaly u méně druhů a lokus Parm05 byl amplifikován pouze u 4 testovaných druhů. Dále Brown *et Jordan* (2009) testovali u buřňáka trinidadského PCR amplifikaci s primery navrženými pro 53 mikrosatelitních lokusů, které byly izolovány od buřňáka bělobradého z čeledi buřňákovití, albatrosa stěhovavého a šedohlavého z čeledi albatrosovití a od kulíka mořského (*Charadrius*

*alexandrinus*) z řádu dlouhokřídílí. Našli 6 polymorfních lokusů: Paequ3, Paequ13 (Techow *et* O’Ryan, 2004), 10C5, 12H8 (Dubois *et al.*, 2005), De11 (Burg, 1999) a *Calex01*, který byl izolován od kulíka mořského z řádu dlouhokřídílí (Küpper *et al.*, 2007).

Andris *et al.* (2010) u **buřňáka Bulwerova** popsali 11 polymorfních dinukleotidových mikrosatelitních lokusů. Ptačí DNA byla získána pomocí QIAamp Tissue Kit (QIAGEN) ze vzorků krve. Mikrosatelity byly izolované z obohacené knihovny s použitím biotinem značených mikrosatelitních oligonukleotidových sond, magnetických kuliček potažených streptavidinem a kompetentních buněk *E. coli* JM 09 (Promega). Screenování rekombinantních klonů proběhlo podle Dubois *et al.* (2005). 352 pozitivních klonů bylo sekvenováno pomocí genetického analyzátoru ABI 3130 (Applied Biosystems). Ze 282 sekvencí vhodných pro navržení primerů vybrali pro další analýzu 25 lokusů s nejvyšším počtem nepřerušovaných repetic. Variabilitu těchto mikrosatelitů zkoumali na 91 dospělých jedincích buřňáka Bulwerova. Z 25 bylo 24 lokusů polymorfních, avšak kvůli amplifikačním problémům a snížené heterozygotnosti u některých lokusů bylo možné dále pracovat pouze s 11 polymorfními mikrosatelity: Bb2, Bb3, Bb7, Bb10–Bb12, Bb20–Bb23 a Bb25. Bylo detekováno 2–8 alel na lokus. Všech 44 testovaných samic bylo pro lokus Bb11 homozygotních, což napovídá, že je tento mikrosatelit vázaný na pohlaví, konkrétně na chromozom Z. S primery navrženými pro 11 polymorfních mikrosatelitů izolovaných u buřňáka Bulwerova byla provedena *cross-species* PCR amplifikace u dalších tří druhů z řádu trubkonosí: buřňáka bělobradého a buřňáka modravého z čeledi buřňákovití a buřňáčka Monteirova z čeledi buřňáčkovití. U buřňáka bělobradého bylo nalezeno 6 polymorfních lokusů, u buřňáka modravého 10 a u buřňáčka Monteirova polymorfismus vykazovalo 5 amplifikovaných mikrosatelitních lokusů, přičemž počet alel v publikaci není uveden.

U **buřňáka havajského**, který je ohroženým druhem, izolovali Welch *et* Fleischer (2011) 10 nových polymorfních mikrosatelitů. Ze vzorků tkání jednoho samce a jedné samice buřňáka havajského byla izolována DNA, která byla poté rozštěpána a fragmenty o velikosti 200 až 1000 bp byly ligovány do SNX linkerů a amplifikovány. Amplifikované fragmenty byly hybridizovány s oligonukleotidovými sondami a byly obohaceny o mikrosatelitní sekvence. Takto připravené fragmenty byly opět amplifikovány, poté ligovány do pBluescript II SK + plazmidů a následně transformovány do ultrakompetentní *E. coli*. Pozitivní klony poté byly screenovány a bylo vybráno 54 klonů nesoucích vhodné sekvence, pro které byly navrženy primery pomocí Primer 3 softwaru (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Pouze 10 z amplifikovaných

lokusů (Ptero01–Ptero10) bylo polymorfních. U těchto lokusů bylo zaznamenáno 3–10 alel. Dále bylo na *cross-species* PCR amplifikaci u buřňáka havajského testováno 37 již publikovaných párů primerů, které byly izolované od druhů z řádů trubkonosí (Burg, 1999, Techow *et al.*, 2004, Friesen *et al.*, 2006, Bried *et al.*, 2008, Brown *et al.*, 2009, Gonzalez *et al.*, 2009), dlouhokřídli (Given *et al.*, 2002) a pěvci (Dawson *et al.*, 1997). Variabilita těchto lokusů byla zjišťována na 15 jedincích buřňáka havajského. Deset z 37 mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních: Parm01, Parm02, Parm03, Parm05 (buřňák trinidatský; Brown *et al.*, 2009), Cd2, Cd10 (buřňák šedý; Bried *et al.*, 2008), PuffPM2 (buřňák baleárský; Gonzalez, *et al.*, 2009), Paequ3 (buřňák bělobradý; Techow *et al.*, 2004), včetně RBG18M a RBG29 izolovaných od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) z řádu dlouhokřídli (Given *et al.*, 2002). Testované lokusy odvozené od lesňáčka žlutohého (*Dendroica petechia*) (Dawson *et al.*, 1997) z řádu pěvci u buřňáka havajského nevykazovaly polymorfismus.

Sedm polymorfních mikrosatelitních lokusů Patbel1–Patbel7 našli Quillfeldt *et al.* (2012) pro účely studia mimopárové paternity u **buřňáka útlozobého**. Genomická DNA byla extrahována ze vzorků peří od 25 dospělých jedinců a vzorků krve odebrané 43 dospělým a 34 mládřatům buřňáka útlozobého. Extrakce byla provedena za použití DNeasy Tissue Kit (QIAGEN). PCR amplifikace, izolace mikrosatelitů a klonování bylo provedeno podle Klauke *et al.* (2009). Ze sedmi polymorfních mikrosatelitů, které byly nalezeny, byl jeden (Patbel5) homozygotní u všech samic a heterozygotní u všech samců, což naznačovalo, že tento mikrosatelitní lokus je vázaný na chromozom Z. Počet alel u polymorfních lokusů se pohyboval od 5 do 16.

Genetickou variabilitu u populace **buřňáka světlonohého** za použití mikrosatelitů studovali Hardesty *et al.* (2013). Mikrosatelity izolovali ze sestavené genomické DNA knihovny. Genomická DNA byla izolována od 71 jedinců buřňáka světlonohého, buď z peří, nebo krve. DNA byla pomocí restričních enzymů rozštěpena na fragmenty o velikosti 300 až 750 párů bazí, které byly zachycené magnetickými biotinylovanými kuličkami a následně ligované do plazmidu pUC19. Klony, které obsahovaly mikrosatelity, byly náhodně vybrané pro sekvenování a mikrosatelitní lokusy byly poté amplifikovány pomocí PCR. Amplifikované produkty byly separovány na polyakrylamidovém gelu. Polymorfismus mikrosatelitních lokusů byl testován na 90 jedincích buřňáka světlonohého. Jedenáct mikrosatelitů (Pc A105, Pc A107, Pc A115, Pc B11, Pc B109, Pc B115, Pc C104, Pc D3, Pc D103, Pc D109 a PcD121) bylo polymorfních se 3–13 alelami.

Moodley *et al.* (2015) u **buřňáka útlozobého** našli 25 nových polymorfních mikrosatelitních lokusů. Pro analýzu mikrosatelitních markerů u druhů z řádu trubkonosí použili vzorky krve, svalové tkáně a peří, které byly odebrány 7 různým druhům z čeledi buřňákovití: buřňákovi útlozobému, holubímu (*Pachyptila desolata*), širokozobému (*P. vittata*), Salvinovu (*P. salvini*), hrdliččímu (*P. turtur*), modravému a Wilsonovu (*Oceanites oceanicus*). Nejprve od dvou jedinců buřňáka útlozobého, jejichž DNA byla získána z krve za použití Qiagen DNeasy Tissue Kit (QIAGEN), izolovali DNA sekvence obsahující mikrosatelity. Z obohacené genomické knihovny, která byla vytvořena, byly izolovány vhodné mikrosatelitové sekvence, pro něž byly v programu Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000) navrženy primery. Třicet šest z navržených párů primerů bylo testováno na polymorfismus a *cross-species* amplifikaci u 4 nepříbuzných jedinců buřňáka útlozobého a 3 nepříbuzných jedinců buřňáka holubího. Dvacet šest mikrosatelitů vykazovalo u buřňáka útlozobého polymorfismus a amplifikovalo se u obou testovaných druhů. Další analýza těchto 26 mikrosatelitů byla provedena na 77 jedincích buřňáka útlozobého. Počet alel na lokus se pohyboval od 5 do 48. Jeden z testovaných mikrosatelitních lokusů byl vyřazen, protože vykazoval vazbu na lokusy Pacbel\_03731 a Pacbel\_08509, přičemž tyto dva lokusy se statisticky jeví jako na sobě nezávislé. Zbývajících 25 párů primerů bylo použito při *cross-species* PCR amplifikaci u dalších 5 výše zmíněných testovaných druhů. Nejméně polymorfních lokusů (15) bylo nalezeno u buřňáka Wilsonova z čeledi buřňákovití, jež je buřňákovi útlozobému pouze vzdáleně příbuzný.

### 3.4.6.3 Mikrosatelity u druhů z čeledi albatrosovití

V rámci čeledi albatrosovití bylo doposud *de novo* izolováno 53 mikrosatelitů od albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), šedohlavého (*D. chrysostoma*), jižního (*D. antipodensis*), černonohého (*Phoebastria nigripes*), bělohřbetého (*P. albatrus*), laysanského (*P. immutabilis*) a černobrvého (*Thalassarche melanophris*).

Burg (1999) izolovala 26 mikrosatelitů od dvou druhů: **albatrosa šedohlavého** a **stěhovavého**. Genomická DNA izolovaná od těchto druhů byla rozštěpována restriktivní endonukleázou *AluI* na fragmenty o velikosti 300–800 bp, které byly ligovány do pUC19 plazmidu a poté proběhla transformace do bakterií *E. coli*. Po sestavení genomické knihovny byly navrženy primery pro 31 vybraných mikrosatelitových sekvencí, úspěšná amplifikace však proběhla pouze u 26 lokusů. Variabilita těchto lokusů byla testována na genomické DNA izolované od 90 jedinců albatrosa stěhovavého, kde bylo nalezeno 15

polymorfních lokusů se 2–11 alelami a genomické DNA 50 jedinců albatrosa šedohlavého, kde bylo zjištěno 16 polymorfních lokusů se 2–10 alelami. U albatrosa stěhovavého nebyly amplifikovány 2 lokusy: Dc10 a Dc19. Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace 26 izolovaných mikrosatelitů byla otestována u albatrosa černobrvého, kde bylo polymorfních 15 lokusů se 2–7 alelami.

Analýzu struktury populace u **albatrosa černobrvého** a **šedohlavého** na základě studia sekvencí mitochondriální DNA a mikrosatelitů provedli Burg *et* Croxall (2001). Genomickou DNA izolovali z krve odebrané 73 jedincům albatrosa černobrvého a 50 jedincům albatrosa šedohlavého. Ke 26 mikrosatelitům, které izolovala Burg (1999), přidali nově nalezený lokus De35 a poté vybrali 7 nejvíce variabilních mikrosatelitních lokusů pro populační analýzu obou druhů. U lokusu De35 bylo u 5 různých populací albatrosa černobrvého detekováno 7–12 alel a u 4 různých populací albatrosa šedohlavého 8–22 alel.

Při studiu fylogenetických vztahů 3 druhů albatrosů: **albatrosa stěhovavého** a 2 druhů albatrosů (*D. gibsoni* a *D. antipodensis*), pro které je v češtině stejné označení – **albatros jižní**, našli Burg *et* Croxall (2004) nový mikrosatelit De37. Vzorky krve byly odebrány 772 jedincům a DNA byla izolována pomocí Chelexu. U všech 772 vzorků byla testována variabilita 8 již dříve popsaných mikrosatelitů (Burg, 1999) a jednoho nově nalezeného mikrosatelitu De37 (Burg *et* Croxall, 2004). Lokus De33 se ukázal jako vázaný na pohlaví. Lokus De37 byl polymorfní u všech testovaných druhů se 6 nebo 7 detekovanými alelami.

Deset polymorfních mikrosatelitových markerů u **albatrosa stěhovavého** popsali Dubois *et al.* (2005). DNA byla extrahována ze vzorků ptačí krve pomocí QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelity byly izolovány ze sestavené genomické knihovny obohacené o repetece, s použitím biotinem značených mikrosatelitových sond a magnetických kuliček potažených streptavidinem. Klony, které obsahovaly mikrosatelity byly screenovány a 132 z těchto pozitivních klonů bylo sekvenováno. Pro 94 sekvencí byly navrženy primery a 15 z těchto sekvencí bylo vybráno pro další analýzu. Variabilita mikrosatelitů byla testována na třech populacích albatrosa stěhovavého, z nichž každá čítala dvacet jedinců. Deset z 15 lokusů bylo polymorfních se 2 až 13 alelami. Na třech druhích z čeledi buňňákovití taktéž z řádu trubkonosí: buňňákovi Bulwerově, šedém a sněžném (*Pagodroma nivea*), byla testována *cross-species* PCR amplifikace 10 mikrosatelitů izolovaných u albatrosa stěhovavého. U všech testovaných druhů se amplifikovalo 8 lokusů, přičemž u žádného z druhů se nepodařilo amplifikovat ani lokus

6F12 ani 7D8. U buňáka Bulwerova bylo pět lokusů polymorfních, u buňáka šedého bylo všech 8 amplifikovaných lokusů monomorfních a u buňáka sněžného byly polymorfní tři lokusy. Počet alel u polymorfních lokusů Dubois *et al.* (2005) neuvádějí.

Hernandez *et al.* (2014) charakterizovali 15 polymorfních mikrosatelitů u **albatrosa černonohého, laysanského a bělohřbetého**. Genomická DNA byla izolována ze svalové tkáně 36 jedinců albatrosa černonohého, 12 jedinců albatrosa laysanského a 3 jedinců albatrosa bělohřbetého pomocí Qiagen DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN). Pomocí NEBNext Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) a NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs) byla sestavena genomická knihovna. Bylo vybráno 44 lokusů s di-, tri- a tetranukleotidovými repeticemi, pro něž byly navrženy primery pomocí programu Primer 3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Šestnáct z těchto lokusů bylo dále testováno na polymorfismus na souboru 51 jedinců složeném ze zástupců od druhů albatrosa černonohého, laysanského a bělohřbetého. U albatrosa černonohého a laysanského bylo polymorfních 13 lokusů s 2–18, respektive s 2–14 alelami. U albatrosa bělohřbetého se ukázalo jako polymorfních 14 mikrosatelitů s 2–7 alelami na lokus.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál pro analýzu byl poskytnut pracovníky Zoologické zahrady Dvůr Králové. Krev byla odebrána 6 nepříbuzným jedincům plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Genomická DNA byla z krve izolována vedoucím bakalářské práce za použití fenol-chloroformové metody. Koncentrace izolované DNA rozpuštěné v TE pufru se pohybovala od 10 do 50 µg/ml.

### 4.2 PCR amplifikace mikrosatelitních lokusů

Každá reakce sestávala z amplifikace genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského jedním párem testovaných primerů, které byly přidány do PCR reakční směsi, jejíž složení je uvedeno v tabulce č. 1. PCR reakční směs byla připravována pro 6 vzorků. Postup práce byl následující:

1. Po rozmražení složky PCR mixu zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Napipetovat reagentie do 1,5ml mikrozkuvek podle tabulky č. 1. PCR reakční směs zvortexovat a zcentrifugovat.
3. Do PCR mikrozkuvek pipetovat 1 µl genomické DNA plameňáka karibského o koncentraci 10–50 µg/ml.
4. Do každé PCR mikrozkuvky připipetovat 9 µl PCR reakční směsi.
5. Mikrozkuvky vložit do termocykléru s časovým a teplotním profilem nastaveným dle schématu č. 1.

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

Složky PCR mixu	Objem (µl)
Deionizovaná voda	44,4
Reaction Buffer 10x	6,7
Roztok MgCl <sub>2</sub> (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
aTaq DNA polymeráza (5 U/µl)	1,0

**Schéma č. 1:** Základní časový a teplotní profil PCR reakce

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

Ke *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského bylo použito celkem 213 párů primerů. Dvě až sedm párů bylo navržených pro PCR amplifikaci všech doposud izolovaných *de novo* mikrosatelitů od zástupců z řádu trubkonosí (Procellariiformes). Zbylých 6 párů primerů amplifikuje *cross-species* polymorfní mikrosatelity u zástupců z řádu trubkonosí, přičemž 5 párů bylo původně navržených pro PCR amplifikaci mikrosatelitů u zástupců z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) a 1 pár pro amplifikaci lokusu u lesňáčka žlutohého z řádu pěvci (Passeriformes). Všechny testované mikrosatelitní lokusy izolované u zástupců z řádu trubkonosí včetně zdrojového druhu a autorů publikací uvádím v tabulce č. 2, mikrosatelity izolované u zástupců z řádu dlouhokřídlí a pěvci v tabulce č. 3.

**Tabulka č. 2:** Seznam mikrosatelitů izolovaných od zástupců druhů z řádu trubkonosí testovaných na polymorfismus u plameňáka karibského. Ve sloupcích tabulky je uvedena čeleď, zdrojový druh, název mikrosatelitního lokusu a literární zdroj.

Čeleď	Zdrojový druh	Název lokusu	Literární zdroj
albatrosovití	albatros stěhovavý ( <i>Diomedea exulans</i> )	De1, De2, De3, De7, De11, De12, De17, De18, De25, De30, De33	Burg, 1999
		7D8, 12C8, 11H7, 10C5, 11H1, 6A3, 12H8, 11F3, 6F12, 12E1	Dubois <i>et al.</i> , 2005
	albatros šedohlavý ( <i>Diomedea chrysostoma</i> )	Dc5, Dc9, Dc10, Dc16, Dc19, Dc20, Dc21, Dc22, Dc26, Dc27, Dc31	Burg, 1999
	albatros šedohlavý, albatros stěhovavý	D6, D24, D29, D32	Burg, 1999
	albatros černobrvý ( <i>Thalassarche melanophris</i> ), albatros šedohlavý	De35	Burg <i>et</i> Croxall, 2001



Tabulka č. 2: Pokračování 1.

Čeď	Zdrojový druh	Název lokusu	Literární zdroj
<b>albatrosovití</b>	albatros jižní ( <i>Diomedea gibsoni</i> a <i>D. antipodensis</i> ), albatros stěhovavý	De37	Burg <i>et</i> Croxall, 2004
	albatros laysanský ( <i>Phoebastria immutabilis</i> )	LAAL1, LAAL7, LAAL10, LAAL19	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
	albatros bělohřbetý ( <i>Phoebastria albatrus</i> )	STAL4, STAL8, STAL12, STAL18, STAL 20, STAL 24	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
	albatros černonohý ( <i>Phoebastria nigripes</i> )	BFAL4, BFAL11, BFAL14, BFAL19, BFAL20	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
<b>buřňákovití</b>	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
	buřňák taiko ( <i>Pterodroma magentae</i> )	Tch6, Tch25	Lawrence, 2008
	buřňák baleárský ( <i>Puffinus mauretanicus</i> )	Puff 1.5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2C, PuffG2F, Puff G11F, Puff PM2, Puff Sma6	Gonzales <i>et al.</i> , 2009
	buřňák trinidatský ( <i>Pterodroma arminjoniana</i> )	Parm01, Parm02, Parm03, Parm04, Parm05, Parm06	Brown <i>et</i> Jordan, 2009
	buřňák Bulwerův ( <i>Bulweria bulwerii</i> )	Bb2, Bb3, Bb7, Bb10, Bb11, Bb12, Bb20, Bb21, Bb22, Bb23, Bb25	Andris <i>et al.</i> , 2010
	buřňák havajský ( <i>Pterodroma sandwichensis</i> )	Ptero01, Ptero02, Ptero03, Ptero04, Ptero05, Ptero06, Ptero07, Ptero08, Ptero09, Ptero10	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011
	buřňák světlonohý ( <i>Puffinus 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
	buřňák útlozobý ( <i>Pachyptila belcheri</i> )	Patbel1, Patbel2, Patbel3, Patbel4, Patbel5, Patbel6, Patbel7	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012
Pacbel_00386, Pacbel_02653, Pacbel_03731, Pacbel_04240, Pacbel_04355, Pacbel_04991, Pacbel_07265, Pacbel_08509, Pacbel_08867, Pacbel_08988, Pacbel_09021, Pacbel_09528		Moodley <i>et al.</i> , 2015	

**Tabulka č. 2:** Pokračování 2.

Čeď	Zdrojový druh	Název lokusu	Literární zdroj
<b>buňákovití</b>	buňák útlozobý ( <i>Pachyptila belcheri</i> )	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
<b>buňáčkovití</b>	buňáček Monteirův ( <i>Oceanodroma 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
	buňáček dlouhokřídľý ( <i>Oceanodroma 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
	buňáček dlouhokřídľý, buňáček madeirský ( <i>Oceanodroma castro</i> )	Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B, OI10-39	Sun <i>et al.</i> , 2009

**Tabulka č. 3:** Seznam mikrosatelitů izolovaných od zástupců druhů z řádu pěvců a dlouhokřídľů testovaných na polymorfismus u plameňáka karibského. Ve sloupcích tabulky je uveden řád, čeď, zdrojový druh, název mikrosatelitního lokusu a literární zdroj.

Řád	Čeď	Zdrojový druh	Název lokusu	Literární zdroj
Pěvců (Passeriformes)	lesňáčkovití (Parulidae)	lesňáček žlutoňhý ( <i>Dendroica petechia</i> )	Dpμ01	Welch <i>et</i> Fleischer (2011) podle Dawson <i>et al.</i> (1997)
Dlouhokřídľů (Charadriiformes)	alkovití (Alcidae)	alkoun obecný ( <i>Cephus guilemots</i> )	Cco5-21	Friesen <i>et al.</i> (2006)
	kulíkovití (Charadriidae)	kulík mořský ( <i>Charadrius alexandrinus</i> )	Calex-01	Brown <i>et al.</i> (2009) podle Küpper <i>et al.</i> (2007)

**Tabulka č. 3:** Pokračování.

<b>Řád</b>	<b>Čeleď</b>	<b>Zdrojový druh</b>	<b>Název lokusu</b>	<b>Literární zdroj</b>
Dlouhokřídlí (Charadriiformes)	rackovítí (Laridae)	racek novozélandský ( <i>Larus novaehollandiae scopulinus</i> )	RBG18, RBG18M, RBG29	Lawrence (2008) a Welch <i>et</i> Fleischer (2011) podle Given <i>et al.</i> (2002)

### **4.3 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace**

Uvedený postup je optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm. Elektroforetická separace probíhá za denaturačních podmínek.

1. Malé i velké sklo dobře umýt vodou se saponátem pomocí kartáčku. Následně obě skla opláchnout deionizovanou vodou, osušit, dvakrát opláchnout 96% ethanolem a poté osušit papírovou utěrkou.
2. Plochu většího skla, která přijde do kontaktu s gelem, ošetřit přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů (Rain-off). Přípravek rozetřít papírovým ubrouskem a po zaschnutí (asi po 5 minutách) opláchnout deionizovanou vodou a sklo osušit papírovou utěrkou.
3. Plochu kratšího skla, která přijde do kontaktu s gelem, ošetřit 1 ml molekulárního lepidla. Tento roztok rozetřít papírovým ubrouskem a po zaschnutí (asi po 5 minutách) čtyřikrát opláchnout 96% ethanolem. Po každém opláchnutí sklo osušit papírovou utěrkou.
4. Na vodorovně umístěnou polystyrénovou desku v digestoři položit větší sklo tak, aby jeho ošetřená plocha směřovala nahoru. Po stranách většího skla umístit 0,4 mm silné spacers a na ně položit menší sklo tak, aby jeho ošetřená plocha směřovala dolů. Spacers posunout k okrajům skel a v jejich místě skla na každé straně sepnout pomocí dvou klipsů. Hrany skel jsou na jedné kratší straně v zákrytu a na druhé kratší straně jsou od sebe okraje skel posunuty přibližně o 2,5 cm.
5. V kádince si připravit polyakrylamidový gel. Promíchaný roztok pomalu nalévat mezi skla a druhou rukou poklepávat na sklo, aby se zabránilo vzniku vzduchových bublin v gelu.

6. Po vyplnění celého prostoru mezi skly gelem, vsunout mezi skla v místě plnění hřebínek jeho rovnou stranou tak, aby byl asi 0,5 cm hluboko. Skla sepnout čtyřmi klipsy v místě hřebínku. Gel nechat nejméně jednu hodinu polymerizovat.
7. Po utuhnutí gelu odstranit ze skel všechny klipsy a skla pečlivě omýt od zbytků polyakrylamidu. V oblasti hřebínku si při omývání počínat velice opatrně. Následně sklo osušit papírovou utěrkou. Osušená skla s gelem pevně upevnit do elektroforetické komůrky pomocí šroubovacích úchytů tak, aby čelo s hřebínkem směřovalo nahoru a kratší sklo bylo orientováno směrem k hliníkové desce elektroforetické komůrky.
8. Katodový i anodový prostor zalít 0,5 x TBE pufrem. Hřebínek z gelu opatrně vytáhnout a vzniklý prostor mezi skly důkladně vyčistit proudem pufru z injekční stříkačky. Uzavřít katodový i anodový prostor. Po nasazení elektrod na zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastavit hodnotu výkonu 90 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA). Gel nechat předeřhřát přibližně 30 minut za těchto podmínek.
9. Během nahřívání gelu si připravit vzorky: smístit 1 objemový díl PCR produktu a 1 díl nanášecího pufru. Připravené vzorky 5 minut před nanesením na gel vložit na 3 minuty do denaturačních podmínek v termocykléru vytemperovaném na 96 °C. Po vyjmutí mikrozkušavek se vzorky z termocykléru je nutné je okamžitě vložit do ledové tříště, čímž se zabrání renaturaci denaturovaných vláken DNA produktů.
10. Během denurace připravených vzorků vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit katodu a otevřít katodový prostor. Pomocí injekční stříkačky znovu dobře vyčistit mezeru mezi skly vzniklou vyjmutím hřebínku proudem pufru, aby došlo k odstranění zbytků polyakrylamidu a rozpuštěné močoviny. Do vyčištěné mezery mezi skly opatrně vsunout hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu. Dávat pozor aby nedošlo k ulomení zoubků.
11. Pomocí pipety nanést po 2  $\mu$ l zdenaturovaných vzorků do mezer mezi zoubky hřebínku. Po nanesení všech vzorků uzavřít katodový prostor, nasadit elektrodu a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastavit hodnotu výkonu 70 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000 W/150 mA).
12. Separace vzorků trvá 1,5–3,5 hodiny v závislosti na tom, jakou mají separované vzorky molekulární hmotnost. Orientační určení toho, s jakou rychlostí separace probíhá, je možné pomocí barviv obsažených v nanášecím pufru: bromfenolová modř se pohybuje stejně rychle jako úsek DNA dlouhý asi 60 párů bází a xylenová modř jako úsek DNA dlouhý asi 220 párů bází.

13. Po uplynutí doby elektroforetické separace vzorků vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit obě elektrody a pomocí matice na pravé straně elektroforetické komůrky otevřít kanálek, kterým přeteče pufr z katodové části do sběrného prostoru. Povolit šrouby úchytných skel a skla s gelem vyjmout a položit vodorovně tak, aby menší sklo směřovalo nahoru. Vytáhnout oba spacery, skla od sebe oddělit odpáčením čepelí nože.
14. Oddělené menší sklo, na kterém je přilepený gel otočit gelem nahoru a v této poloze vložit do fotomisky. Fotomisku umístit na třepačku v digestoři, sklo s gelem zalít fix/stop roztokem a nechat jej působit na gel asi 20 minut.
15. Fix/stop roztok slít do baňky. Sklo s gelem 3x promýt deionizovanou vodou. Následně promývat sklo s gelem na třepačce v 1% roztoku  $\text{HNO}_3$  po dobu 5 minut. Poté roztok vylít a gel 4x promýt deionizovanou vodou.
16. Fotomisku s gelem opět umístit na třepačku, zalít 0,1% roztokem  $\text{AgNO}_3$  s přídatkem 1,2 ml formaldehydu a nechat působit asi 30 minut.
17. Připravit jednu fotomisku s deionizovanou vodou a druhou s 800 ml vychlazeného roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (vývojka), do kterého se přidá 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu\text{l}$  1% roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .
18. Fotomisku s gelem zalitým  $\text{AgNO}_3$  po uplynutí 30 minut sejmout ze třepačky. Roztok slít do zásobní baňky. Sklo s gelem vyjmout a ponořit do připravené misky s deionizovanou vodou na 5 vteřin. Po okapání sklo s gelem přemístit do fotomisky s vývojkou, tu umístit na třepačku. Dojde k vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů.
19. Zastavit vyvíjení zbarvení dříve než začne vystupovat tmavé pozadí pomocí fix/stop roztoku. Roztok nechat na gel působit asi 2 minuty.
20. Sklo s gelem ponořit na 2 minuty do deionizované vody. Poté přenést do sušárny, kde se gel vysouší po dobu 30 minut při 90 °C.
21. Vyhodnotit usušený gel na negatoskopu.
22. Nepotřebný gel nechat odlepit ze skla v roztoku  $\text{NaOH}$  o koncentraci 1 mol/l. Sklo s gelem nechat v roztoku až několik hodin. Sklo umýt a následně je možné jej znovu použít.

#### **4.4 Použité chemikálie**

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5 U/ $\mu\text{l}$ ), 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 – Na<sub>2</sub>EDTA (Lachner)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- 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 (Serva)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin – TEMED (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Rain-off – tekuté stěračce (Sheran)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan – Tris (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř – Xylencyanol FF (AppliChem)

#### **4.5 Použité roztoky**

##### Akrylamid, 6% zásobní roztok:

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

##### Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok:

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

Fix/stop roztok:

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

Hydroxid sodný, 1 mol/l roztok:

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

Kyselina dusičná, 1% roztok:

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

Molekulární lepidlo:

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

Nanášecí pufrovací roztok:

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

Peroxodisíran amonný, 10% roztok:

- 1 g peroxodisíranu amonného
- Rozpustit v 10 ml deionizované vody
- Připravený roztok uchovávat v chladničce.

Polyakrylamidový gel, 6% roztok:

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

TBE pufr, 10x zásobní roztok:

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

Vývojka:

- 24 g uhličitanu sodného
- 800 ml deionizované vody

- vychladit na teplotu nižší než 10 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl roztoku thiosíranu sodného

#### **4.6 Použité laboratorní přístroje**

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette 0,5–10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl–1 ml (ThermoLabsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl–1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocyklér GenePro (BIOER Technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)



## 5 Výsledky

V rámci této bakalářské práce jsem testovala *cross-species* PCR amplifikaci 213 mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Dvě stě sedm z 213 testovaných mikrosatelitů zahrnuje všechny mikrosatelity doposud popsané u zástupců z řádu trubkonosí, z čehož 53 bylo odvozených od zástupců z čeledi albatrosovití, 100 od zástupců z čeledi buňňákovití a 54 mikrosatelitů bylo popsáno u zástupců z čeledi buňňáčkovití. U zbylých 6 testovaných mikrosatelitů se jednalo o *cross-species* mikrosatelity polymorfni u zástupců z řádu trubkonosí. Pět z těchto *cross-species* mikrosatelitů bylo *de novo* izolováno od zástupců z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes): 1 mikrosatelit od alkouna obecného (*Cepphus guilemots*), 1 mikrosatelit od kulíka mořského (*Charadrius alexandrinus*) a 3 mikrosatelity od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*), a 1 byl *de novo* izolován od lesňáčka žlutohého (*Dendroica petechia*) z řádu pěvci (Passeriformes).

Jako základní teplotu *annealingu* při *cross-species* PCR amplifikaci jsem použila 50 °C. V případě, kdy nebyl daný PCR produkt amplifikován, jsem teplotu *annealingu* postupně snižovala až na 42 °C. Pokud byl PCR produkt po elektroforetické separaci v 6% polyakrylamidovém gelu příliš intenzivní a nehodnotitelný, optimalizovala jsem podmínky PCR reakce tak, aby bylo možno vyhodnotit, zda se jedná o mikrosatelit monomorfni či polymorfni, a u takového pak provést jeho genotypizaci. Optimalizace podmínek PCR reakce zahrnovala postupné zvyšování teploty *annealingu*, přičemž nejvyšší teplota činila 72 °C, či snížení koncentrace hořčičných iontů v PCR reakční směsi z původních 1,6 nmol/l na 1,2 nmol/l při snížení na třičtvrtě koncentraci, nebo na 0,8 nmol/l při snížení na poloviční koncentraci. V některých případech bylo třeba pro lepší rozlišitelnost alel mikrosatelitního lokusu prodloužit čas elektroforetické separace z 90 minut až na 240 minut.

Všech 213 testovaných mikrosatelitů poskytlo monomorfni nebo polymorfni produkt a celkem jsem u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského našla 52 polymorfni mikrosatelitů. U dvou z těchto polymorfni lokusů, konkrétně u PuffG2C, který byl izolován u buňňáka baleárského z řádu buňňákovití a u Omn24, který byl nalezen u buňňáčka Monteirova z řádu buňňáčkovití, se ani po několika pokusech o optimalizaci podmínek PCR nepodařilo získat takový produkt, u něž by se dal vyhodnotit počet alel a provést genotypizaci. Z tohoto důvodu jsem dva zmíněné lokusy označila jako nehodnotitelné a nejsou zařazeny do statistik. U zbylých 50 polymorfni mikrosatelitů

se počet alel pohyboval od 2 do 5, přičemž žádný z těchto lokusů nevykazoval vazbu na pohlaví. U lokusu Pc A107 jsem detekovala 2 polymorfni oblasti. Přehled vyhodnocených polymorfni mikrosatelitů uvádím v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4:** Charakteristika 50 nalezených polymorfních mikrosatelitů testovaných na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského. Ve sloupcích tabulky je uveden název mikrosatelitního lokusu včetně kódu v databázi GenBank (Accession number - Accession no.), sekvence primerů ve směru 5' → 3', jednotka repetice, zdrojový druh, teplota *annealingu* ( $T_a$ ), čas elektroforetické separace (ELFO) a počet alel.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	$T_a$ [°C]	ELFO [min]	Počet alel
De3 (AF096789)	F: CTGCCAAAAGAATTCCTG R: CCAACAAGGACTAAGCCCAA	AC	albatros stěhovavý	63	135	3
Dc5 (AF096790)	F: AGGAGGGAACTTCTCCAG R: AGCAGGGAGTGACTTGAGGAG	AC/CAC/CA	albatros šedohlavý	67	90	2
Dc22 (AF096803)	F: AGTGGGATGGGTGTATCAGG R: TGGACTAGAGGCCTTGTCTGA	CA		57	90	2
Dc31 (AF096810)	F: CTGACTCTCTGGGATGAGCC R: GTACCCCTGGAAAGCCAGAC	CA/GC/AN/AC/ AG		63	90	3
BFAL4 (neuvedeno)	F: TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R: GTTTGCCATTTTAAACTGTCATTGGC	TC	albatros černonohý	65	150	2
BFAL14 (neuvedeno)	F: CAAGAAGCTATTATTAAGCTATTTGTTCC R: GGGTGTGAAATCGTTTCTGC	ATTT		63	90	3
LAAL7 (neuvedeno)	F: CAGCATGACCAAATCCATCC R: GTTTGGACACAAATGCCGTTCTTG	AGC	albatros laysanský	63	120	5
LAAL19 (neuvedeno)	F: ATGACCAGTGCCATCAACAG R: TGGCCAGATGTGATTTGAAG	ATCC		62	90	3
STAL18 (neuvedeno)	F: CAGTTCAAAGAAGGAAAACC R: GTTTGGAGTGGTCTTGGGTACAGC	ATG	albatros bělohřbetý	60	90	2
Parm01 (EU360817)	F: CTGGACTCAGTGCCCTCTTC R: CAGGGCAGAAGCTCGTCTAT	CA	buřňák trinidadský	68	180	4
Ptero05 (HQ918222)	F: TGCTGTCTGGCTGGGTTAC R: CTGCCTGCCTTCTGAAAC	AAG/AGG	buřňák havajský	68	90	2

Tabulka č. 4: Pokračování 1.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T <sub>a</sub> [°C]	ELFO [min]	Počet alel
Bb11 (HM171894)	F: CTGGCATCAGTCCCTTACCT R: GCTCTTACGAATCCGCTACC	GA	buňák Bulwerův	69	90	5
Bb21 (HM171897)	F: CTGATGTTCCAGGCCCTAAT R: CCTCTGAGCCAGCTAATTCC	TG		60	90	2
Bb22 (HM171898)	F: TTCACAGCAGAATCACCTCAG R: GCTCAAAGGGTGGGAATTGTT	TG		65	90	2
Bb25 (HM171901)	F: GCATCCCTGGAACCTCTGATT R: GAATGAACCAGCCAGAAGGT	AC		60	90	3
Paequ3 (AY371071)	F: TGTGGGTGCAGTAGAGCA R: CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	GA	buňák bělobradý	66	90	2
Paequ7 (AY371073)	F: TGCAGACCTGACTTTCACAGCTC R: CCTCCAAACATCCAGCCATC	GT		68	240	2
Paequ8 (AY371074)	F: TATTCTGAGACTTGC GTTATCC R: GTGATCCATTAGTTGATGTCTACTG	CA		62	180	2
Cd5 (EU029087)	F: CTGCACAGACTGAGAGTATAAGATTC R: GGCTTAAAGGGTAAATACACATGG	GT/AT	buňák šedý	48	90	2
Puff G2F (EU158899)	F: GCTCTCCCAGTTTGCACG R: TCCCATGCTTTAACCCTG	GT	buňák baleárský	59	180	3
Pc A105 (JX435471)	F: ACAGGAAAGAGAAGAGGATTTG R: ATGGGGAGAGCGTATGTG	CA	buňák světlonohý	50	90	2
Pc A107 (JX435472)	F: AAAGCCAGTAGGTGTATTCAAC R: AAGTGGGAGGAAAGAGTGTAG	GT		50	90	2 + 2
Pc B109 (JX435475)	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATTCAGGATGTAGGTTC	CAA		65	120	3

**Tabulka č. 4:** Pokračování 2.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T <sub>a</sub> [°C]	ELFO [min]	Počet alel
Pc B115 (JX435476)	F: AAATAAGAGGCGTGTTCTAAGA R: ATTCGTGGATTGAGATAAAGAC	GTT/ATT	buňák světloňohý	51	150	3
Pc D103 (JX435479)	F: GGAAAGATGTCATGCTGATGA R: GTGGGAGATTCATAGGCCAAAG	GATA/GATG		58	90	2
Patbel1 (JF288775)	F: CCCTTGCTGCAGCTCATTAT R: GGAATGGCTGAAAGAGTGCT	CTAT/CTAC	buňák útlózobý	49	90	3
Patbel4 (JF288778)	F: TCGTCCATGTTAGAAGGCATC R: TGTGCCACGAGTTCTTTGTG	CTAT		50	90	2
Pacbel_00386 (neuveďeno)	F: GCATGTCTACAAACAAGCACG R: TCACTGGAAACCAGAGTAGGC	AC		50	90	3
Pacbel_03731 (neuveďeno)	F: TAGTGGACTGGTCACAGCAC R: TAGCAGCTGGAGAGCATCAG	AC		62	90	2
Pacbel_07265 (neuveďeno)	F: CGTCACTTTAATAGCGCTGGC R: ACCCTGATTTTCCAGTCCG	GT		58	120	3
Pacbel_08509 (neuveďeno)	F: TCTGGTTTCACAAATACCTACTGC R: CCTAGTTTCGACACAAAGG	TG		60	90	2
Pacbel_08988 (neuveďeno)	F: CTGATCGGTTGTGCTCTGTG R: GCGGAAAGATCCTAACAAG	CT		69	90	3
Pacbel_09021 (neuveďeno)	F: ATCTGCGCATGCAGTGATAG R: CACAGCTAGCAGCATTGACC	GT		69,5	90	2
Pacbel_09528 (neuveďeno)	F: AACTGTTTGCTCCACACCAC R: ATGGCTTGGAAGTCTCCCTG	AC		60	90	2
Pacbel_10033 (neuveďeno)	F: CAACGCGCTTTTGGTTTTGC R: GGCCACTCACCACAATACAAG	TG		59	90	2

Tabulka č. 4: Pokračování 3.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T <sub>a</sub> [°C]	ELFO [min]	Počet alel
Pacbel_17944* (neuvedeno)	F: TACAACCGTTCTCCCTGTGG R: GGAGAAGCAGGCAGCAATAC	TG	buňák útlazobý	46	180	3
Oc28B (FJ238097)	F: GCGTTGACCAGCAAATAGTC R: GGAAGGCTACCACAATTTCA	TG	buňáček madeirský	56	90	2
Oc49 (FJ238098)	F: TGCTTCTGGATTTGTTTTGC R: CAAACCGTGTGACCCAGATA	CA		57	120	3
Oc63 (FJ238100)	F: TCACACCAACCTCCATGAAA R: AACGGGGAATATGTGGTTCTT	GA		53	90	2
Oc79 (FJ238102)	F: TATTCCTGGCCATGTTTTCC R: GCTTCCTTTGTTTCAGTTTAGA	AC		60	90	2
Oc87B (FJ238104)	F: TTTAAGGAACGCAAGTCAGG R: GTGATTCTTGCAGTGGCTTT	GA		65	150	2
Omn1 (JQ303226)	F: TTTTTGTTTTTGATTCTCACATTCTT R: TGGGAGTGACCTGCTTACCT	AC/TG		buňáček Monteirův	52	90
Omn3 (JQ303228)	F: GCGCTTGAAAGGGTGAAGTA R: TCCCATCTGAGATTTAAGGAAGA	AC/GT	62		120	2
Omn8* (JQ303232)	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTAAG	AC	44		90	3
Omn21 (JQ303238)	F: TTTTGTAGCTCTTTTGTAGCTAGCCTT R: TAACCCAGAAAAATGCAGCC	GTT	51		90	3
Oi10-39 (FJ238106)	F: TTAAGAACAGAGCCTGACTTG R: ACAAATCTCATGTCCTTGG	GT	buňáček dlouhokřídý	55	90	2
Ole02 (FR696378)	F: GGGTTCCTGTTACCAAAGGGCAG R: CATAAGCACAAAGGTTCTAGCTCCCTC	GAAA		71	240	5

**Tabulka č. 4:** Pokračování 4.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T <sub>a</sub> [°C]	ELFO [min]	Počet alel
Ole09 (FR696385)	F: GGCCTGGATTCTGCGTGTTGGG R: CAGCTACAGGCCACGGGTGC	CA	buňáček dlouhokřídlý	72	120	2
Ole13* (FR696389)	F: GGGCCAGACATGTATTTACTGGAGGG R: GTGCATCCGAGAGCCGACGC	TG		42	180	3
RBG29 (AY091853)	F: CCTAGCTTTTTGGACTCAGT R: GTGGTGTTGCAATAGGATTC	GT	racek novozélandský	62	150	4

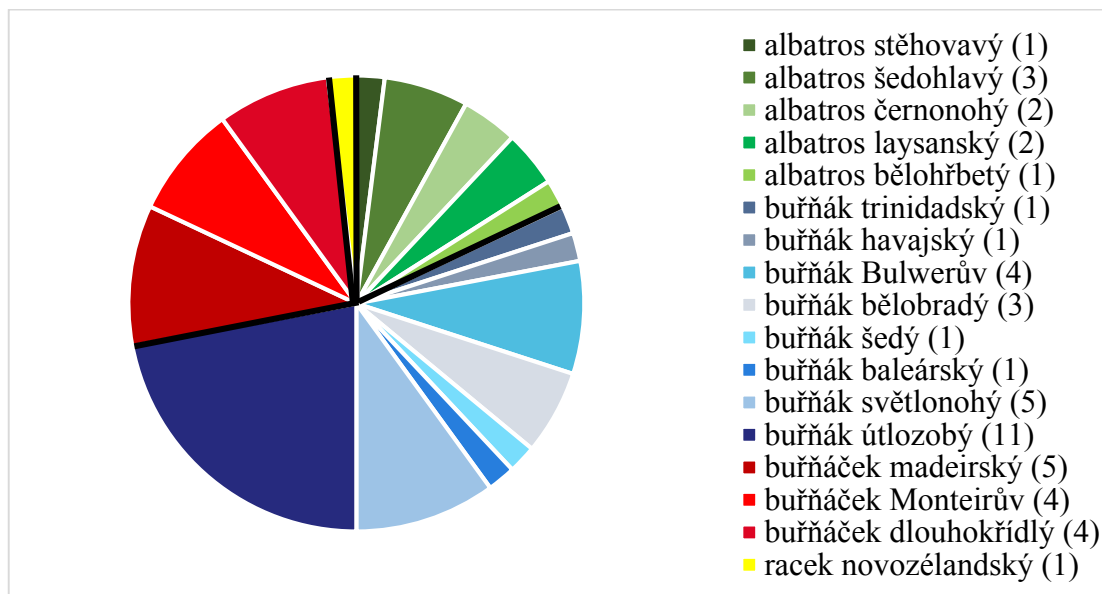
**Legenda:** \* – tříčtvrteční koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi (1,2 nmol/l) oproti standardní koncentraci (1,6 nmol/l)

Pro testované mikrosatelitní lokusy jsem vypočítala úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitu. Při testování celkového počtu 213 mikrosatelitů a nalezení 50 polymorfních lokusů hodnota úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace testovaných mikrosatelitů u plameňáka karibského činí 23 %.

Z 50 polymorfních mikrosatelitů bylo 49 izolovaných od zástupců z řádu trubkonosí a 1 od racka novozélandského z řádu dlouhokřídlí. V rámci řádu trubkonosí, kde celková úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace činila 24 %, bylo nejvíce polymorfních lokusů amplifikovaných u plameňáka karibského izolováno od zástupců z čeledi buňňákovití, kdy ze 100 testovaných mikrosatelitů bylo 27 polymorfních a jednalo se tedy o 27% úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace a nejméně pak pocházelo od zástupců z čeledi albatrosovití, kdy z 53 mikrosatelitů bylo polymorfních 9 lokusů a úspěšnost se rovnala 17 %. Z čeledi buňňáčkovití bylo u plameňáka karibského vyhodnoceno jako polymorfní 13 mikrosatelitů z 54 otestovaných, což odpovídá 24% úspěšnosti. Nejvíce polymorfních mikrosatelitů bylo odvozených od buňňáka útlozobého z čeledi buňňákovití, kdy polymorfismus u plameňáka karibského vykazovalo 11 z 32 testovaných lokusů. Vůbec největší úspěšnost (46 %) měla *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů od buňňáka světlonohého, taktéž z čeledi buňňákovití, kdy z 11 testovaných bylo u plameňáka karibského 5 lokusů polymorfních. Rozdělení polymorfních mikrosatelitů u plameňáka karibského z hlediska čeledí a druhů, u kterých byly izolovány, je znázorněno v grafu č. 1.

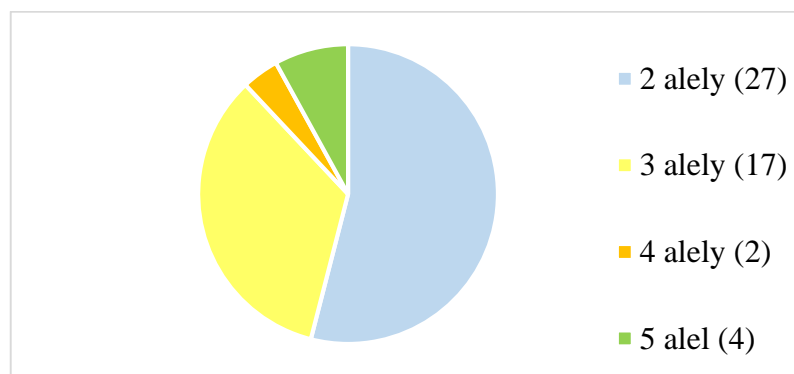


**Graf. č. 1:** Rozdělení 50 polymorfních mikrosatelitů podle zdrojových druhů a čeledí, u kterých byly původně izolovány. Počet lokusů odvozených od zástupců jednotlivých druhů z čeledi albatrosovití (zelená), buňákovití (modrá) a buňáčkovití (červená) z řádu trubkonosí a od druhu z čeledi rackovití (žlutá) z řádu dlouhokřídílí, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňka karibského, je uveden v závorce. Jednotlivé čeledi jsou od sebe odděleny černou čarou.



Co se týče počtu alel, které byly zjištěny u 50 polymorfních mikrosatelitů, u více než poloviny mikrosatelitních lokusů (27) jsem detekovala pouze 2 alely, u 17 lokusů 3 alely, u 2 lokusů 4 alely a u 4 lokusů 5 alel. Rozdělení polymorfních lokusů podle počtu alel u plameňáka karibského je znázorněno v grafu č. 2.

**Graf. č. 2:** Rozdělení 50 polymorfních mikrosatelitů odvozených od zástupců z řádu trubkonosí a dlouhokřídílí podle počtu alel, které pro jednotlivé lokusy byly detekovány u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Počet mikrosatelitů s daným počtem alel je uveden v závorce.



U 50 polymorfních mikrosatelitů amplifikovaných na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského byly vyhodnoceny genotypy, které uvádím v tabulce č. 5. Pro mikrosatelit Pc A107 zmiňuji dva genotypy, jelikož jsem u tohoto lokusu pozorovala 2 oblasti polymorfismu. První genotyp odpovídá produktu s vyšší relativní molekulovou hmotností, druhý poté produktu s nižší relativní molekulovou hmotností.

**Tabulka č. 5:** Genotypy 50 nalezených polymorfních mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Ve sloupcích tabulky je uveden název mikrosatelitního lokusu, zdrojový druh, počet alel a genotypy 6 nepříbuzných jedinců.

Název lokusu	Zdrojový druh	Počet alel	Genotypy
De3	albatros stěhovavý	3	$\frac{3}{3}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{3}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{3}{3}$
Dc5	albatros šedohlavý	2	$\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$
Dc22		2	$\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$
Dc31		3	$\frac{1}{3}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$
BFAL4	albatros černonohý	2	$\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$
BFAL14		3	$\frac{1}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$
LAAL7	albatros laysanský	5	$\frac{3}{3}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{4}{5}$ $\frac{1}{5}$
LAAL19		3	$\frac{2}{3}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{3}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{3}$ $\frac{3}{3}$
STAL18	albatros bělohřbetý	2	$\frac{1}{1}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$
Parm01	buňňák trinidadský	4	$\frac{1}{2}$ $\frac{3}{4}$ $\frac{1}{3}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$
Ptero05	buňňák havajský	2	$\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{1}$
Bb11	buňňák Bulwerův	5	$\frac{1}{4}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{5}{5}$
Bb21		2	$\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$
Bb22		2	$\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$
Bb25		3	$\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{3}$ $\frac{3}{3}$
Paequ3	buňňák bělobradý	2	$\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$
Paequ7		2	$\frac{1}{1}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{1}$
Paequ8		2	$\frac{1}{1}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$
Cd5	buňňák šedý	2	$\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$
Puff G2F	buňňák baleárský	3	$\frac{1}{3}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{3}{3}$
Pc A105	buňňák světlonohý	2	$\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$
Pc A107		2 + 2	$\frac{1}{1}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{1}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{2}{2}$

**Tabulka č. 5:** Pokračování.

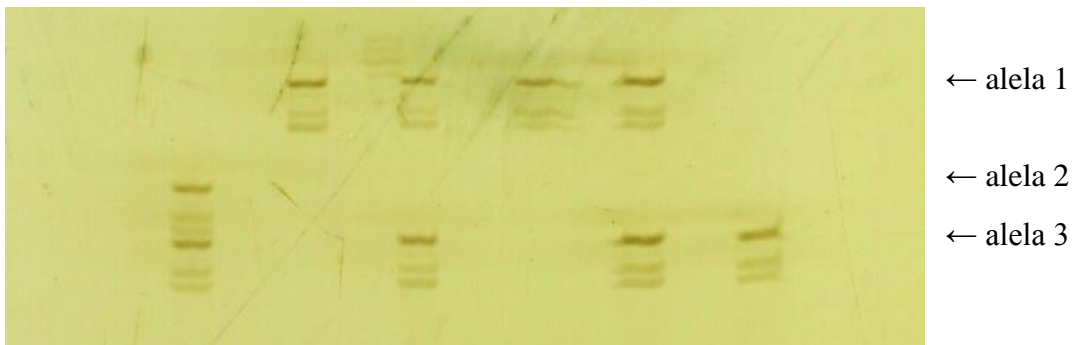
Název lokusu	Zdrojový druh	Počet alel	Genotypy	
Pc B109	buňňák světlonohý	3	$1/2$ $1/1$ $1/2$ $2/3$ $1/1$ $1/2$	
Pc B115		3	$1/3$ $2/3$ $3/3$ $2/2$ $1/3$ $1/3$	
Pc D103		2	$2/2$ $1/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$	
Patbel1	buňňák útlozobý	3	$2/2$ $2/2$ $1/3$ $2/2$ $2/3$ $2/2$	
Patbel4		2	$1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $2/2$ $2/2$	
Pacbel_00386		3	$1/3$ $1/2$ $1/3$ $1/1$ $1/2$ $1/1$	
Pacbel_03731		2	$1/1$ $2/2$ $1/1$ $2/2$ $1/2$ $1/1$	
Pacbel_07265		3	$2/2$ $1/3$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$	
Pacbel_08509		2	$2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$	
Pacbel_08988		3	$3/3$ $3/3$ $2/3$ $1/3$ $2/3$ $1/2$	
Pacbel_09021		2	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $1/1$	
Pacbel_09528		2	$2/2$ $1/2$ $1/1$ $2/2$ $1/1$ $1/1$	
Pacbel_10033		2	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/1$ $1/2$ $2/2$	
Pacbel_17944		3	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/3$ $2/3$ $2/3$	
Oc28B		buňňáček madeirský	2	$1/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
Oc49			3	$1/3$ $2/3$ $3/3$ $3/3$ $1/3$ $1/3$
Oc63	2		$1/1$ $1/1$ $2/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$	
Oc79	2		$1/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$	
Oc87B	2		$1/2$ $1/1$ $2/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$	
Omn1	buňňáček Monteirův	5	$2/2$ $1/5$ $2/3$ $2/4$ $2/2$ $2/3$	
Omn3		2	$2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$	
Omn8		3	$3/3$ $1/2$ $2/3$ $1/1$ $3/3$ $1/3$	
Omn21		3	$1/2$ $2/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/3$	
OI10-39	buňňáček dlouhokřídý	2	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/1$ $2/2$ $2/2$	
Ole02		5	$2/5$ $1/5$ $4/4$ $2/3$ $2/4$ $3/4$	
Ole09		2	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$	
Ole13		3	$1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/3$	
RBG29	racek novozélandský	4	$1/1$ $3/4$ $1/3$ $2/2$ $1/2$ $1/2$	

Na následujících fotografiích je možno vidět výsledek elektroforetické separace PCR produktu získaného *cross-species* PCR amplifikací lokusu Patbel4 (viz obrázek č. 2) a LAAL19 (viz obrázek č. 3) u šesti nepřibuzných jedinců plameňáka karibského.

**Obrázek č. 2:** Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Patbel4 u šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, u kterého byly detekovány 2 alely, jež jsou v obrázku označeny šípkami.



**Obrázek č. 3:** Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu LAAL19 u šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, u kterého byly detekovány 3 alely, jež jsou v obrázku označeny šípkami.



Všechny nalezené polymorfní *cross-species* mikrosatelity byly zatím otestovány pouze na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského, což byl pro potřeby nalezení polymorfních lokusů dostačující počet. Do budoucna by však bylo vhodné tyto mikrosatelity popsat na souboru 30 jedinců plameňáka karibského, jejichž genomickou DNA má Laboratoř populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky na PřF UP v Olomouci k dispozici, a zjistit jejich charakteristiky pomocí programu Cervus (Kalinowsky *et al.*, 2007) a GenePop (Rousset, 2008).

## 6 Diskuze

V této práci jsem u plameňáka karibského pomocí *cross-species* PCR amplifikace s využitím primerů amplifikujících převážně polymorfní mikrosatelitní lokusy u zástupců z řádu trubkonosí, přičemž se jednalo o 207 *de novo* izolovaných mikrosatelitů a 6 *cross-species* mikrosatelitů odvozených od zástupců z řádu dlouhokřídlí a pěvci, našla 50 polymorfních lokusů se 2 až 5 alelami. *Cross-species* PCR amplifikaci 213 mikrosatelitů jsem provedla na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, u kterého vykazovalo polymorfismus 49 mikrosatelitů izolovaných od druhů z řádu trubkonosí a 1 mikrosatelit izolovaný od racka novozélandského z řádu dlouhokřídlí.

Z 53 párů primerů navržených pro mikrosatelity izolované od zástupců z čeledi albatrosovití 9 párů amplifikovalo polymorfní lokus u plameňáka karibského. Z těchto 9 polymorfních byl jeden lokus původně izolován od albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), 3 od albatrosa šedohlavého (*D. chrysostoma*), 2 od albatrosa černonohého (*Phoebastria nigripes*), 2 od albatrosa laysanského (*P. immutabilis*) a jeden od albatrosa bělohřbetého (*P. albatrus*).

Burg (1999) izolovala od albatrosa stěhovavého a šedohlavého 26 mikrosatelitů. Varianta PCR, kterou autorka při analýze použila, využívá dvou rozdílných teplot *annealingu*, přičemž prvních 7 cyklů probíhá za  $T_{a1}$  a zbylých 25 cyklů pak za  $T_{a2}$ . Pro mikrosatelit De3 našla Burg (1999) při  $T_{a1}$  50 °C a  $T_{a2}$  54 °C u 90 jedinců albatrosa stěhovavého 3 alely. Stejný počet alel jsem detekovala i já při *cross-species* PCR amplifikaci lokusu u plameňáka karibského, avšak za použití  $T_a$  63 °C. U lokusu Dc5 jsem při  $T_a$  67 °C našla 2 alely, zatímco autorka použila  $T_{a1}$  46 °C a  $T_{a2}$  48 °C a u 50 jedinců albatrosa šedohlavého detekovala 4 alely. U lokusu Dc22 jsem stejně jako autorka našla 2 alely, avšak na rozdíl od autorky, která provedla PCR s  $T_{a1}$  48 °C a  $T_{a2}$  52 °C jsem použila  $T_a$  57 °C. Lokus Dc31 izolovaný od albatrosa šedohlavého, u kterého autorka při  $T_{a1}$  48 °C a  $T_{a2}$  52 °C nedetekovala polymorfismus, jsem u plameňáka karibského při  $T_a$  63 °C vyhodnotila jako polymorfní se 3 alelami. Autorka 26 nalezených mikrosatelitů otestovala také na *cross-species* PCR amplifikaci u 50 jedinců albatrosa černobrvého, kde našla pro lokus De3 3 alely, pro Dc5 5 alel a pro Dc22 4 alely a lokus Dc31 vyhodnotila jako monomorfní.

Hernandez *et al.* (2014) našli pro albatrosa černonohého, laysanského a bělohřbetého 15 mikrosatelitů. Variabilitu nalezených mikrosatelitů otestovali u 36

jedinců albatrosa černonohého, 12 jedinců albatrosa laysanského a 3 jedinců albatrosa bělohřbetého. U všech lokusů použili stejnou  $T_a$ , a to 60 °C. U albatrosa černonohého detekovali pro lokus BFAL4 8 alel a pro lokus BFAL14 4 alely. U albatrosa laysanského a bělohřbetého našli pro lokus BFAL4 4 respektive 2 alely a pro lokus BFAL14 po 3 alelách. Já jsem u plameňáka karibského pro lokus BFAL4 při  $T_a$  65 °C našla 2 alely a pro lokus BFAL14 při  $T_a$  63 °C pak alely 3. U albatrosa laysanského uvádějí autoři pro lokus LAAL7 4 alely a pro lokus LAAL19 6 alel. U albatrosa černonohého a bělohřbetého detekovali u lokusu LAAL7 4 respektive 2 alely a u lokusu LAAL19 po 4 alelách. Já jsem pro amplifikaci lokusu LAAL7 použila  $T_a$  63 °C a detekovala jsem 5 alel a pro lokus LAAL19, u kterého jsem našla 3 alely, jsem zvolila  $T_a$  62 °C. Lokus STAL18 se při testování variability u albatrosa bělohřbetého ukázal jako monomorfní avšak u albatrosa černonohého i laysanského detekovali autoři 7 alel na lokus. U plameňáka karibského jsem se stejnou teplotou *annealingu* jako použili autoři publikace (60 °C) detekovala u lokusu STAL18 2 alely.

Pro čeled' buňňákovití bylo doposud popsáno 100 mikrosatelitů. U plameňáka karibského jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace za použití primerů navržených pro tyto mikrosatelity našla 28 polymorfních lokusů: po jednom lokusu izolovaném od buňňáka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*), havajského (*P. sandwichensis*) a šedého (*Calonectris diomedea*), 2 lokusy izolované od buňňáka baleárského (*Puffinus mauretanicus*), 3 od bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), 4 od Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), 5 od světlonohého (*Puffinus carneipes*) a 11 od útlozobého (*Pachyptila belcheri*). Polymorfismus u plameňáka karibského nevykazovaly pouze mikrosatelity izolované od buňňáka taiko (*Pterodroma magentae*).

Brown *et* Jordan (2009) izolovali u buňňáka trinidadského 6 mikrosatelitů, z čehož pouze mikrosatelit Parm01 byl při *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského polymorfní. S teplotou *annealingu* 68 °C jsem detekovala 4 alely. Autoři publikace u 320 jedinců buňňáka trinidadského pro tento lokus při  $T_a$  55 °C detekovali 10 alel. Variabilitu lokusů autoři testovali také na dalších 17 druzích z řádu trubkonosí a 1 druhu z řádu tučňáci. Lokus Parm01 vykazoval polymorfismus u 12 druhů z řádu trubkonosí, kde autoři detekovali 2–9 alel na lokus, přičemž počet genotypovaných jedinců se pohyboval od 5 do 17, a také u tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*) z řádu tučňáci, kde u 8 jedinců našli 7 alel.

Welch *et al.* (2011) popsali 10 polymorfních mikrosatelitů pro buňáka havajského. U plameňáka karibského se mi podařilo amplifikovat pouze jeden polymorfní lokus Ptero05 a při  $T_a$  68 °C jsem detekovala 2 alely. Při amplifikaci lokusu u 40 jedinců buňáka havajského použili autoři  $T_a$  53 °C a našli 3 alely.

Andris *et al.* (2010) charakterizovali 11 mikrosatelitů u buňáka Bulwerova. Pro PCR amplifikaci mikrosatelitů u 91 jedinců tohoto druhu zvolili  $T_a$  58 °C. Pro lokus Bb11 autoři publikace našli 3 alely a tento lokus byl homozygotní u všech samic, což naznačuje vazbu na chromozom W. Já jsem použila  $T_a$  69 °C a u plameňáka karibského jsem detekovala pro lokus Bb11 5 alel, přičemž se lokus nejevil jako vázaný na pohlaví. U lokusu Bb21 byly autory zjištěny 3 alely, já jsem našla o jednu méně při  $T_a$  60 °C. K amplifikaci lokusu Bb22 jsem použila  $T_a$  65 °C a zjištěné 2 alely odpovídaly počtu alel tohoto lokusu uvedeném v publikaci. Pro lokus Bb25 jsem při  $T_a$  60 °C detekovala 3 alely, autoři pro tento lokus uvádějí 6 alel. Všechny 11 mikrosatelitů testovali také na *cross-species* PCR amplifikaci u buňáka bělobradého a modravého z čeledi buňákovití a buňáčka Monteirova z čeledi buňáčkovití. Lokusy Bb11 a Bb22 vyhodnotili jako polymorfní u všech tří testovaných druhů, lokus Bb25 byl polymorfní u obou druhů z čeledi buňákovití a lokus Bb21 byl polymorfní pouze u buňáka modravého, přičemž počet alel autoři neuvádějí.

U buňáka bělobradého izolovali Techow *et al.* (2004) 7 mikrosatelitů. Tři z těchto polymorfních mikrosatelitů izolovaných u buňáka bělobradého vykazovaly polymorfismus i u plameňáka karibského, kde jsem u všech 3 lokusů detekovala 2 alely a teploty *annealingu* byly: 66 °C pro Paequ3, 68 °C pro Paequ7 a 62 °C pro Paequ8. Autoři publikace amplifikovali lokus Paequ3 u 93 jedinců při  $T_a$  55 °C a popsali 9 alel, u lokusu Paequ7 našli u 94 jedinců při  $T_a$  64 °C 5 alel a u Paequ8 u 77 jedinců při  $T_a$  58 °C 3 alely. Všechny 7 mikrosatelitů autoři testovali na *cross-species* PCR amplifikaci u dalších 6 druhů z řádu trubkonosí: buňákovití tristsanském, obrovském a Hallově z čeledi buňákovití a albatrosovi stěhovavém, šedohlavém a černobrvém z čeledi albatrosovití. Lokus Paequ3 byl polymorfní u všech testovaných druhů kromě albatrosa stěhovavého, lokus Paequ7 byl polymorfní u buňáka tristsanského a obrovského a lokus Paequ8 vykazoval polymorfismus u buňáka tristsanského a albatrosa stěhovavého. Počet alel autoři neuvádějí.

Bried *et al.* (2008) popsali 11 polymorfních mikrosatelitů u buňáka šedého. U lokusu Cd5 při  $T_a$  58 °C u 43 jedinců zjistili 6 alel, já jsem u plameňáka karibského při  $T_a$  48 °C detekovala 2 alely. Mikrosatelity byly autory testovány také na *cross-species*

PCR amplifikaci u albatrosa stěhovavého z čeledi albatrosovití a buňňáka bělobradého a Bulwerova z čeledi buňňákovití. Lokus Cd5 byl amplifikován pouze u buňňáka bělobradého, kde jej autoři vyhodnotili jako monomorfní.

Deset polymorfních mikrosatelitních lokusů izolovali u buňňáka baleárského Gonzales *et al.* (2009). Polymorfismus ověřili genotypizací 55 jedinců. Pro lokus PuffG2C autoři při  $T_a$  50 °C našli 7 alel. U plameňáka karibského byl tento lokus úspěšně amplifikován a vykazoval polymorfismus, ale nepodařilo se jej vyhodnotit ani po optimalizaci podmínek PCR reakce, která zahrnovala snižování teploty annealingu až na 42 °C a změnu koncentrace hořčnatých iontů z 1,6 nmol/l v PCR reakční směsi na poloviční (koncentrace  $Mg^{2+}$  v PCR reakční směsi: 0,8 nmol/l) a následně třičtvrtěční hodnotu (koncentrace  $Mg^{2+}$  v PCR reakční směsi: 1,2 nmol/l). U lokusu PuffG2F autoři při  $T_a$  60 °C našli 2 alely, já jsem při  $T_a$  59 °C detekovala 3 alely.

U buňňáka světlonohého charakterizovali Hardesty *et al.* (2012) 11 polymorfních lokusů. Variabilitu testovali na souboru 84 jedinců. U lokusu Pc A105 při  $T_a$  57 °C detekovali 8 alel, já jsem při teplotě *annealingu* 50 °C našla pouze 2 alely. Při  $T_a$  55 °C u lokusu Pc A107 našli 5 alel. Já jsem při *cross-species* PCR amplifikaci lokusu Pc A107 u plameňáka karibského při  $T_a$  50 °C pozorovala 2 místa polymorfismu, přičemž u obou polymorfních oblastí bylo možné vidět 2 alely. U lokusu Pc B109 detekovali při  $T_a$  57 °C 5 alel. Já jsem s teplotou *annealingu* 65 °C našla pro Pc B109 u plameňáka karibského 3 alely. Pro lokus Pc B115 našli Hardesty *et al.* (2012) při  $T_a$  55 °C 3 alely, stejně tak jako já, ale při snížené  $T_a$  o 4 °C. Pro lokus Pc D103 u buňňáka světlonohého při  $T_a$  59 °C detekovali 6 alel, já jsem s o 1 °C nižší  $T_a$  našla pouze 2 alely.

Quillfeldt *et al.* (2012) izolovali 7 polymorfních mikrosatelitů u buňňáka útlozobého. U 68 jedinců pro lokus Patbel1 našli 7 alel a pro lokus Patbel4 9 alel, teplotu *annealingu* autoři v publikaci neuvádějí. Já jsem u obou lokusů detekovala nižší počet alel: pro Patbel1 3 alely ( $T_a$  49 °C) a pro Patbel4 2 alely ( $T_a$  50 °C).

Dvacet pět mikrosatelitů u buňňáka útlozobého charakterizovali Moodley *et al.* (2015). Pro amplifikaci všech lokusů u 77 jedinců použili  $T_a$  56 °C. Jedenáct alel našli u mikrosatelitu Pacbel\_00386, u kterého jsem při  $T_a$  50 °C detekovala 3 alely. Velký počet alel (48) vyhodnotili u lokusu Pacbel\_03731, pro který jsem já při  $T_a$  62 °C našla pouze 2 alely. Pro mikrosatelit Pacbel\_07265 jsem s o 2 °C vyšší  $T_a$ , než použili autoři, detekovala 3 alely, u buňňáka útlozobého našli alel 15. Při  $T_a$  60 °C jsem u lokusu Pacbel\_08509 detekovala 2 alely, což bylo o 7 méně, než je uvedeno v publikaci. Teplotu *annealingu* 69 °C jsem použila při amplifikaci lokusu Pacbel\_08988, kde jsem detekovala



3 alely, autoři 10. Pro lokus Pacbel\_09021 našli Moodley *et al.* (2015) 17 alel, já jsem zvolila  $T_a$  69,5 °C, jelikož při  $T_a$  69 °C byl produkt ještě příliš silný a při  $T_a$  70 °C se již téměř neamplifikoval, a detekovala jsem 2 alely. Dvě alely jsem u plameňáka karibského našla také pro lokusy Pacbel\_09528 ( $T_a$  60 °C) a Pacbel\_10033 ( $T_a$  59 °C), pro které autoři publikace uvádějí 9 alel. Při *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitu Pacbel\_17944 (se 12 alelami u buňáka útlozobého) u plameňáka karibského jsem při optimalizaci podmínek PCR snížila  $T_a$  na 46 °C a koncentraci hořčnatých iontů v PCR reakční směsi jsem z původních 1,6 nmol/l snížila na třičtvrtěnní hodnotu, tudíž 1,2 nmol/l. S takto upravenými podmínkami byl poté lokus amplifikován a vyhodnotila jsem u něj 3 alely. Autoři otestovali všech 25 nalezených mikrosatelitů na *cross-species* PCR amplifikaci u dalších 5 druhů z čeledi buňákovití: buňáka holubího, širokozobého, Salvinova, hrdliččího a modravého a u buňáčka Wilsonova z čeledi buňáčkovití. Kromě lokusů Pacbel\_00386 a Pacbel\_09528, které autoři vyhodnotili jako monomorfní u buňáčka Wilsonova a Pacbel\_03731, který vyhodnotili jako monomorfní u buňáka hrdliččího a buňáčka Wilsonova, vykazovaly jmenované mikrosatelity polymorfismus u všech testovaných druhů se 2–51 alelami na lokus (viz tabulka č. 6).

**Tabulka č. 6:** Mikrosatelity izolované od buňáka útlozobého, které Moodley *et al.* (2015) testovali na *cross-species* PCR amplifikaci u buňáka holubího, širokozobého, Salvinova a hrdliččího z čeledi buňákovití a buňáčka Wilsonova z čeledi buňáčkovití, a které jsem zároveň vyhodnotila jako polymorfní u plameňáka karibského z řádu plameňáci. Ve sloupcích je uveden název mikrosatelitního lokusu a testovaný druh s počtem jedinců (N) a zjištěným počtem alel (A).

Název lokusu	Buňák holubí N; A	Buňák širokozobý N; A	Buňák Salvinův N; A	Buňák hrdliččí N; A	Buňák modravý N; A	Buňáček Wilsonův N; A
Pacbel_00386	79; 13	117; 11	18; 10	33; 2	97; 13	M
Pacbel_03731	75; 51	111; 31	17; 22	M	95; 13	M
Pacbel_07265	72; 15	103; 14	16; 7	21; 6	85; 28	5; 5
Pacbel_08509	75; 11	111; 12	11; 6	16; 5	95; 13	6; 2
Pacbel_08988	77; 9	113; 6	11; 4	33; 2	89; 12	6; 2
Pacbel_09021	75; 22	112; 18	11; 4	10; 6	95; 22	6; 2
Pacbel_09528	72; 14	114; 13	11; 5	32; 7	95; 9	M
Pacbel_10033	78; 9	117; 10	14; 6	35; 5	95; 9	5; 4
Pacbel_17944	78; 12	117; 11	18; 8	30; 10	89; 14	6; 3

**Legenda:** M – monomorfní produkt

V rámci čeledi buňňáčkovití je známo 54 mikrosatelitních lokusů, z čehož 14 bylo po provedení *cross-species* PCR amplifikace u plameňáka karibského vyhodnoceno jako polymorfní. Jednalo se o 5 lokusů izolovaných od buňňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*), 5 lokusů od buňňáčka Monteirova (*O. monteiroi*) a 4 lokusy od buňňáčka dlouhokřídleho (*O. leucorhoa*).

Sun *et al.* (2009) izolovali u buňňáčka madeirského a dlouhokřídleho 10 mikrosatelitů. Při amplifikaci všech lokusů u 27 jedinců buňňáčka madeirského, 22 jedinců buňňáčka Monteirova a 24 jedinců buňňáčka dlouhokřídleho použili stejnou teplotu *annealingu*, a to 50 °C. Pro lokus Oc28B našli autoři po 3 alelách u buňňáčka madeirského a Monteirova, u buňňáčka dlouhokřídleho byl tento lokus monomorfní. Já jsem u plameňáka karibského při  $T_a$  56 °C detekovala 2 alely. Tři alely našli autoři u buňňáčka Monteirova a dlouhokřídleho také pro lokus Oc49, který byl u buňňáčka madeirského vyhodnocen jako monomorfní. Stejný počet alel (3) jsem našla při  $T_a$  57 °C i u plameňáka karibského. U lokusů Oc63 ( $T_a$  53 °C), Oc79 ( $T_a$  60 °C), Oc87B ( $T_a$  65 °C) a O110-39 ( $T_a$  55 °C) jsem při různých teplotách *annealingu* našla 2 alely. Mikrosatelit Oc63 byl polymorfní u buňňáčka madeirského a dlouhokřídleho se 4 alelami, Oc79 vykazoval polymorfismus u buňňáčka madeirského a Monteirova s detekovanými 2 alelami pro oba druhy, u lokusu Oc87B byly nalezeny 3 alely u buňňáčka madeirského, 6 alel u buňňáčka Monteirova a 9 alel u buňňáčka dlouhokřídleho. Taktéž lokus O110-39 byl polymorfní u všech tří testovaných druhů s 8 alelami pro buňňáčka madeirského a Monteirova a 3 alelami pro buňňáčka dlouhokřídleho.

Bried *et al.* (2012) u buňňáčka Monteirova izolovali 18 polymorfních mikrosatelitů, jejichž variabilitu testovali na 125 dospělých jedincích. Pro všechny lokusy použili  $T_a$  58 °C. U lokusu Omn1 detekovali 8 alel, já při  $T_a$  52 °C 5 alel. Dvě alely jsem našla při  $T_a$  62 °C u lokusu Omn3, autoři publikace našli 6 alel. Součástí optimalizace podmínek PCR pro mikrosatelit Omn8 při *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského bylo snížení  $T_a$  na 44 °C a změna koncentrace hořčnatých iontů z původních 1,6 nmol/l v PCR reakční směsi na tříčtvrteční hodnotu (1,2 nmol/l). Při takto upravených podmínkách jsem pro lokus Omn8 detekovala 3 alely, v publikaci je pro tento lokus uvedeno 10 alel. Tři alely jsem také našla u lokusu Omn21 ( $T_a$  51 °C), což bylo o 3 méně než u buňňáčka Monteirova. U lokusu Omn24 detekovali autoři 10 alel, v mém případě nebylo ani po několika pokusech o optimalizaci podmínek PCR možné tento polymorfní mikrosatelit vygenotypovat. Autory byla provedena *cross-species* PCR amplifikace všech 18 nalezených mikrosatelitů u 5 jedinců od každého z následujících

druhů: buňňáčka madeirského z čeledi buňňáčkovití a buňňáka Bulwerova a modravého z čeledi buňňákovití. Lokusy Omn1, Omn3, Omn8, Omn21 a Omn24 vykazovaly u buňňáčka madeirského polymorfismus a detekovali u nich 4, 3, 6, 2 a 4 alely na lokus. Lokus Omn3 byl navíc polymorfní i u buňňáka modravého a autoři u něj našli 3 alely.

Dvacet šest mikrosatelitních lokusů charakterizovali Bicknell *et al.* (2011) u 24 jedinců buňňáčka dlouhokřídleho. U lokusu Ole02 našli při  $T_a$  60 °C 12 alel, já jsem použila  $T_a$  71 °C a detekovala jsem u plameňáka karibského 5 alel. U lokusu Ole09 při  $T_a$  60 °C detekovali 2 alely, stejně tak jako já, ale s odlišnou  $T_a$  72 °C, což byla nejvyšší teplota *annealingu* jakou jsem při optimalizaci podmínek PCR v rámci této bakalářské práce použila. V počtu alel se s autory publikace shodují také u lokusu Ole13, kdy jsem při  $T_a$  42 °C a tříčtvrteční koncentraci hořecnatých iontů v PCR reakční směsi (1,2 mol/l) detekovala 3 alely, stejně jako autoři při  $T_a$  60 °C.

Co se týče testovaných mikrosatelitů z řádu dlouhokřídli, jediným polymorfním mikrosatelitem u plameňáka karibského byl lokus RBG29, který Given *et al.* (2002) izolovali od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) společně s dalšími 6 mikrosatelity. U lokusu RBG29 detekovali při  $T_a$  50 °C u 260 jedinců 5 alel, zatímco já jsem při *cross-species* PCR amplifikaci tohoto lokusu u plameňáka karibského s  $T_a$  62 °C našla 4 alely. Lawrence (2008), která mikrosatelit RBG29 testovala na *cross-species* PCR amplifikaci u buňňáka taiko z čeledi buňňákovití z řádu trubkonosí, našla u 143 jedinců při  $T_a$  55 °C 5 alel. Welch *et al.* (2011) otestovali *cross-species* PCR amplifikaci lokusu RBG29 u 40 jedinců buňňáka havajského a při  $T_a$  53 °C našli 14 alel.

Kromě 5 mikrosatelitů izolovaných od zástupců z řádu dlouhokřídli, které jsem testovala v této bakalářské práci, Drobek (2010) u plameňáka karibského již testoval na *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelity Apy06 a Apy07 (Dawson *et al.*, 2005) pocházející z tohoto řádu, konkrétně od alkounka drobného (*Aethia pygmaea*). Lokus Apy06 vyhodnotil Drobek (2010) u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského jako polymorfní s 5 alelami. Jelikož řád dlouhokřídli také nově náleží do kladu Aequorlitorornithes (Prum *et al.*, 2015), kde již byly na *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského testovány mikrosatelity téměř všech řádů, včetně mikrosatelitů řádu tučňáci (Sphenisciformes), které paralelně se mnou testovala Zlochová (nepublikováno), a to se získáním polymorfních mikrosatelitů, ale mikrosatelitní lokusy izolované od ptáků z řádu dlouhokřídli (s výjimkou 7 výše zmíněných lokusů) nebyly doposud u plameňáka karibského testovány, navrhuji otestování všech zbylých 356

mikrosatelitů, které by přispělo ke zvýšení počtu možných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro tento druh.

Všechny mikrosatelity doposud izolované od zástupců z řádu trubkonosí a několik mikrosatelitů odvozených od zástupců z řádu dlouhokřídlí a pěvci, které vykazují polymorfismus u ptáků z řádu trubkonosí, testovala na *cross-species* PCR amplifikaci také Nedvědová (2015) u 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*), jež je zástupcem řádu brodiví. Celkem nalezla 46 polymorfních lokusů a detekovala u nich 2 až 5 alel. Dvacet mikrosatelitů vykazujících polymorfismus zároveň u nesyta indomalajského a plameňáka karibského uvádím v tabulce č. 7.

**Tabulka č. 7:** Mikrosatelity izolované u zástupců řádu trubkonosí a dlouhokřídlí, které vykazovaly polymorfismus zároveň u plameňáka karibského i nesyta indomalajského. Ve sloupcích je uveden název mikrosatelitního lokusu, zdrojový druh a zjištěné počty alel u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) i nesyta indomalajského (Nedvědová, 2015).

Název lokusu	Zdrojový druh	Plameňák karibský (počet alel)	Nesyt indomalajský (počet alel)
De3	albatros stěhovavý	3	4
Dc22	albatros šedohlavý	2	2
BFAL4	albatros černonohý	2	2
STAL18	albatros bělohřbetý	2	2
Paequ3	buňňák bělobradý	2	2
Paequ7		2	2
Paequ8		2	4
Parm01	buňňák trinidadský	4	3
PuffG2C	buňňák šedý	PU	3
PuffG2F		3	2
Bb22	buňňák Bulwerův	2	2
Pc A105	buňňák světlonohý	2	2
Pc D103		2	2
Pacbel_03731		2	2
Pacbel_07265	buňňák útlozobý	3	2
Pacbel_09021		2	2
Ole09	buňňáček dlouhokřídlý	2	3
Omn8	buňňáček Monteirův	3	4
Omn21		3	2
RBG29	racek novozélandský	4	4

**Legenda:** PU – nehodnotitelný polymorfní lokus

Janušová (2015) použila primery navržené pro všechny známé mikrosatelity izolované u zástupců z řádu trubkonosí a několik *cross-species* polymorfních mikrosatelitů tohoto řádu, původně odvozených od zástupců z řádu dlouhokřídli a pěvci, ke *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) z řádu potápky. Podařilo se jí získat 20 polymorfních mikrosatelitů se 2 až 8 alelami. Všechny 10 mikrosatelitů polymorfních zároveň u potápky roháče i plameňáka karibského uvádím v tabulce č. 8.

**Tabulka č. 8:** Mikrosatelity izolované u zástupců řádu trubkonosí, které vykazovaly polymorfismus zároveň u plameňáka karibského i potápky roháče. Ve sloupcích je uveden název mikrosatelitního lokusu, zdrojový druh a zjištěné počty alel u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) i potápky roháče (Janušová, 2015).

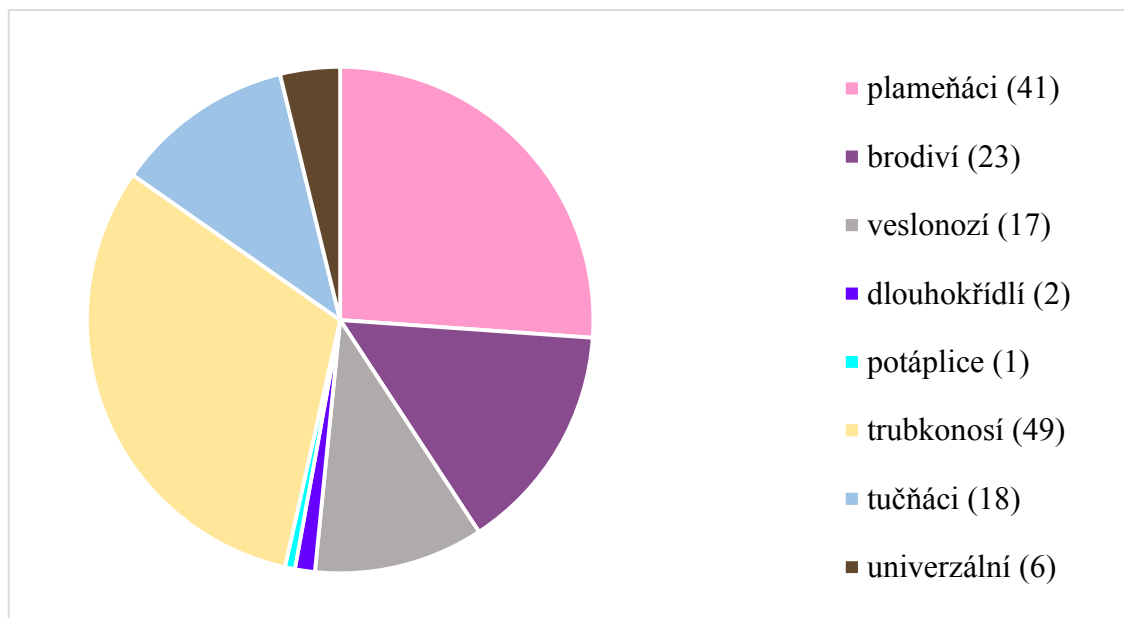
Název lokusu	Zdrojový druh	Plameňák karibský (počet alel)	Potápka roháč (počet alel)
Dc5	albatros stěhovavý	2	4
Pc A107	buňák světlonohý	2+2	2
Pc B109		3	5
Pc B115		3	2
Pc D103		2	2
Bb11		buňák Bulwerův	5
Bb21	2		5
Oc49	buňáček madeirský	3	3
Omn8	buňáček Monteirův	3	6
OI10-39	buňáček dlouhokřídly	2	8

Dva z mikrosatelitů izolovaných od zástupců z řádu trubkonosí testovaných na *cross-species* PCR amplifikaci byly vyhodnoceny jako polymorfní zároveň u plameňáka karibského, nesyta indomalajského i potápky roháče. Jednalo se o lokus PcD103 izolovaný od buňáka světlonohého a lokus Omn8 izolovaný od buňáčka Monteirova. Pro lokus PcD103 byly ve všech třech případech detekovány 2 alely, pro lokus Omn8 jsem u plameňáka karibského našla 3 alely, u nesyta indomalajského detekovala Nedvědová (2015) 4 alely a u potápky roháče popsala Janušová (2015) 6 alel.

Celkem bylo doposud u plameňáka karibského na *cross-species* PCR amplifikaci otestováno 768 mikrosatelitů. Sedm set devět z nich bylo izolovaných od zástupců z řádů (v tradičním pojetí) brodiví, plameňáci, potápky, potáplice, veslonoží, dlouhokřídli, trubkonosí a tučňáci, patřících nyní do kladu Aequorlithornithes, a u zbylých 59 lokusů

se jednalo o univerzální ptačí mikrosatelity (Dawson *et al.*, 2010, Dawson *et al.*, 2013). Bylo nalezeno 157 polymorfních *cross-species* mikrosatelitů, jejichž rozdělení mezi zdrojové řády je znázorněno v grafu č. 3. (Drobek, 2010, Matošková, 2011, Buržáková, 2013, tato práce, Zlochová, nepublikováno).

**Graf č. 3:** Rozdělení 157 polymorfních mikrosatelitů nalezených pro plameňáka karibského pomocí *cross-species* PCR amplifikace univerzálních ptačích mikrosatelitů a mikrosatelitů izolovaných u fylogeneticky blízkých příbuzných druhů patřících do kladu Aequorlornithes. Mikrosatelity jsou rozděleny na základě zdrojových řádů (odpovídajících tradičnímu pojetí), od jejichž zástupců byly odvozeny. Číslo v závorce udává počet polymorfních lokusů odvozených od zástupců konkrétního řádu.



Otestování zbylých 356 mikrosatelitů izolovaných od zástupců z řádu dlouhokřídli by v případě stejné úspěšnosti zisku polymorfního mikrosatelitu, jako tomu bylo u testovaných mikrosatelitních lokusů odvozených od ostatních řádů patřících do kladu Aequorlornithes, mohlo pro plameňáka karibského poskytnout přibližně dalších 75 *cross-species* polymorfních mikrosatelitů.

## 7 Závěr

V této bakalářské práci jsem hledala polymorfní mikrosatelity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) za použití *cross-species* PCR amplifikace s primery navrženými pro mikrosatelitní lokusy odvozené od zástupců z řádu trubkonosí (Procelariiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes) a pěvci (Passeriformes).

Celkem jsem na *cross-species* PCR amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského otestovala 213 mikrosatelitů, z čehož 207 bylo odvozeno od zástupců z čeledi albatrosovití (Diomedidae), buňňákovití (Procelariidae) a buňňáčkovití (Hydrobatidae) patřících do řádu trubkonosí, 5 od zástupců z čeledi alkovití (Alcidae), kulíkovití (Charadriidae) a rackovití (Laridae) z řádu dlouhokřídli a 1 od lesňáčka žlutohého (*Dendroica petechia*) patřícího do čeledi lesňáčkovití (Parulidae) z řádu pěvci.

Pro plameňáka karibského jsem pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace našla 52 polymorfních mikrosatelitů, avšak 2 z těchto lokusů jsem vyloučila jako nehodnotitelné. Celkem jsem tedy pro plameňáka karibského našla 50 polymorfních lokusů, z čehož bylo 49 mikrosatelitů původně izolováno u zástupců z řádu trubkonosí a 1 mikrosatelit u racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) z řádu dlouhokřídli.

Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů od zástupců z řádu trubkonosí u plameňáka karibského činila 24 %. Co se týče jednotlivých čeledí tohoto řádu, největší (27%) úspěšnost vykazovala *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů izolovaných od zástupců z čeledi buňňákovití, kde bylo 27 ze 100 testovaných mikrosatelitů polymorfních. Menší úspěšnost (24 %) měla *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů odvozených od zástupců z čeledi buňňáčkovití, kde bylo polymorfních 13 mikrosatelitů z 54 otestovaných a nejmenší úspěšnost (17 %) jsem pozorovala u *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů izolovaných od druhů z čeledi albatrosovití, kde bylo z 54 testovaných mikrosatelitů pouze 13 polymorfních.

V současné chvíli je pro plameňáka karibského nalezeno celkem 157 polymorfních mikrosatelitů, přičemž celková úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitu v rámci kladu Aequorlitorornithes pro testovaný druh činí 21 %. Vezmu-li v úvahu tuto úspěšnost, otestování 356 zbývajících mikrosatelitních lokusů izolovaných od zástupců z řádu dlouhokřídli (Charadriiformes), taktéž ze stejného kladu, by mohlo pro plameňáka karibského přinést dalších asi 75 polymorfních *cross-species* mikrosatelitů.

## 8 Seznam zkratek

A	adenin
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOP-PCR	PCR amplifikace s degenerovanými oligonukleotidovými primery ( <i>Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR</i> )
EST	místo s expresní adresou ( <i>Expressed Sequence Tag</i> )
G	guanin
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné elementy ( <i>Long Interspersed Nuclear Elements</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
SINEs	krátké rozptýlené jaderné elementy ( <i>Short Interspersed Nuclear Elements</i> )
SSRs	mikrosatelity ( <i>Simple Sequence Repeats</i> )
T	thymin



## 9 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, publikováno online na: <http://biomath.trinity.edu/manuscripts/10-6/mer-10-0209.pdf>, navštíveno dne 2. 3. 2016.
- Baker, A. J. (Ed.) (2000): *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- 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., 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.
- 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.
- Brohede, J., Ellegren, H. (1999): Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences*, 266, 825–833.
- 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.
- Bruford, M. W., Wayne, R. K. (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3, 939–943.
- 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. (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Cracraft, J. (1981): Toward a phylogenetic classification of the recent birds of the world (Class Aves). *The Auk*, 98, 681–714.
- Dakin, E. E., Avise, J. C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504–509.
- Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Galvéz, D., Stewart, I. R., Horsburgh, G. J., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, A. W. J., Preston, S. A. J., Ekblom, R., Slate, J., Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14:176.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica patechia* (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.
- Dawson, D. A., Hunter, F. M., Pandhal, J., Buckland, R., Parham, A., Jones, I. L., Bradshaw, M., Jehle, R., Burke, T. (2005): Assessment of 17 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5–15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes*, 5, 289–297.
- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): *Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Ducks*. Lynx Editions, Barcelona.
- Drobek, A. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Dubois, M.-P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 905–907.
- Duffie, C., Glenn, T. C., Hagen, C., Parker, P. (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 625–627.
- Ellegren, H. (1992): Polymerase-Chain-Reaction (PCR) Analysis of Microsatellites – A New Approach to Studies of Genetic Relationships in Birds. *The Auk*, 109, 886–895.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.-M. (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11, 1591–1604.

- Frias-Soler, R., Tindle, E., Lopez, G. E., Blomberg, S., Studer-Thiersch, A., Wink, M., Tindle, R. (2014): Genetic and Phenotypic Evidence Supports Evolutionary Divergence of the American Flamingo (*Phoenicopterus ruber*) Population in the Galapagos Islands. *Waterbirds*, 37, 349–468.
- 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.
- Friesen, V. L., Smith, A. L., Gómez-Díaz, E. *et al.* (2007): Sympatric speciation by allochrony in seabird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18589–18594.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): *Zoologie obratlovců*. Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Geraci, J., Gaillard, M., Bechet, A., Cezilly, F., Wattier, R. A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*. Manuskript, publikováno online na: <http://tomato.bio.trinity.edu/manuscripts/10-2/mer-09-0396.pdf>, navštíveno dne 25. 1. 2016.
- 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.
- Glenn, T. C., Schable N. A. (2005): Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 395, 202–222.
- 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.
- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, C. C., Yuri, T. (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science*, 320, 1763–1768.
- 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.
- Harding, R. M., Boyce, A. J., Clegg, J. B. (1992): The Evolution of Tandemly Repetitive DNA: Recombination Rules. *Genetics*, 132, 847–859.
- 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.

Chapuis, M.-P., Estoup, A. (2007): Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621–631.

Chen, Z.-Q., Ritzel, R. G., Lin, C. C., Hodgetts, R. B. (1991): Sequence conservation in avian CR1: An interspersed repetitive DNA family evolving under functional constraints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 5814–5818.

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.

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., Prodocimi, 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.

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

Kapil, R. (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations: Dissertation. Denton, University of North Texas, publikováno online na: <http://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc4957/>, navštíveno dne 26. 1. 2016.

Kapil, R., Sawyer, G. M., Preston, L., Benjamin, R. C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*. Manuskript, publikováno

online na: <http://tomato.biol.trinity.edu/manuscripts/10-1/mer-09-0285.pdf>, navštíveno dne 26. 1. 2016.

Klauke, N., Masello, J. F., Quillfeldt, P., Segelbacher, G. (2009): Isolation of tetranucleotide microsatellite loci in the burrowing parrot (*Cyanoliseus patagonus*). *Journal of Ornithology*, 150, 921–924.

Klein, Á., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Major, Á., Lee, P. L. M., Hoffmann, G., Mátics, R., Dawson, D. A. (2009): Microsatellite markers characterized in the barn owl (*Tyto alba*) and of high utility in other owls (Strigiformes: AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1512–1519.

Klitschar, M., Dauber, E.-M., Ricci, U., Cerri, N., Immel, U.-D., Kleiber, M., Mayr, W. R. (2004): Haplotype studies support slippage as the mechanism of germline mutations in short tandem repeats. *Electrophoresis*, 25, 3344–3348.

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.

Lawrence, H. A. (2008): Conservation Genetics of the World's Most Endangered Seabird, the Chatham Island Tāiko. Dissertation. Auckland, Nový Zéland, publikováno online na: <http://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>, navštíveno dne 26. 2. 2016.

Levinson, G., Gutman, G. A. (1987): Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 203–221.

Li, Y.-Ch., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanism: a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453–2465.

Malaua, T., Gilles, A., Megléc, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., Dubut, V., Pech, N., Castagnone-Sereno, P., Délye, Ch., Feau, N., Frey, P., Gauthier, P., Guillemaud, T., Hazard, L., Corre, V., Lung-Escarmant, B., Malé, P.-J. G., Ferreira, S., Martin, J.-F. (2011): High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*, 11, 638–644.

Málková, B. (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Manišová, B. (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Matošková, T. (2010): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

- Mayr, G. (2003): The phylogenetic affinities of the Shoebill (*Balaeniceps rex*). *Journal of Ornithology*, 144, 157–175.
- Mayr, G. (2004): Morphological evidence for sister group relationship between flamingos (Aves: Phoenicopteridae) and grebes (Podicipedidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140, 157–169.
- McCormack, J. E., Harvey, M. G., Faircloth, B. C., Crawford, N. G., Glenn, T. C., Brumfield, R. T. (2013): A Phylogeny of Birds Based on Over 1,500 Loci Collected by Target Enrichment and High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE*, 8, e54848.
- McGuire, H. L., Noor, M. A. F. (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes*, 2, 170–172.
- Megléczy, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N., Martin, J.-F. (2010): QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26, 403–404.
- Meziani, A. (2011): *Phoenicopus ruber* (Online). Animal Diversity Web, navštíveno dne 9. 4. 2016 na [http://animaldiversity.org/accounts/Phoenicopus\\_ruber/](http://animaldiversity.org/accounts/Phoenicopus_ruber/).
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* (2010a): Permanent Genetic Resources Database 1 August 2009–30 September 2009. *Molecular Ecology Resources*, 10, 232–236.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* (2010b): Permanent Genetic Resources Database 1 October 2009–30 November 2009. *Molecular Ecology Resources*, 10, 404–408.
- 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., Chereil, 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.
- Nádvorník, P., Drobek, A., Čihák, K. (2008): Microsatellite markers for the study of paternity in Greater Flamingo (*Phoenicopus roseus*) and Caribbean Flamingo (*P. ruber*). *Journal of Agrobiolgy*, 25, 93–96.
- 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.
- Neff, B. D., Gross, M. R. (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*, 55, 1717–1733.

- 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.
- Piertney, S. B., Goostrey, A., Dallas, J. F., Carss, D. N. (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology*, 7, 138–140.
- Preston, E. L. (2005): Isolation and Characterization of Polymorphic Loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New Tools for Wildlife Management: Dissertation. Denton, University of North Texas, publikováno online na: <http://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc4908/>, navštíveno dne 26. 3. 2015.
- Primmer, C. R., Møller, A. P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365–378.
- Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Møller, A. P., Ellegren, H. (1997): Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research*, 7, 471–482.
- Primmer, C. R., Ellegren, H. (1998): Patterns of Molecular Evolution in Avian Microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 997–1008.
- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo, J. U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36, 348–360.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted 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.
- Rousset, F. (2008): Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologists programmers. In: Miesner S, Krawetz SA (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Human Press Inc., Totowa, NJ, 365–386.
- Santos, M. S., Gonçalves, E. C., Barbosa, M. S. R., Silva, A., Schneider, M. P. C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes*, 6, 307–309.
- Sawyer, G. M., Benjamin, R. C. (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 677–679.

- 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.
- 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.
- Tachida, H., Iizuka, M. (1992): Persistence of Repeated Sequences That Evolve by Replication Slippage. *Genetics*, 131, 471–478.
- 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 Whit-chinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes*, 4, 33–35.
- Tomasulo-Seccomandi, A. M., Schable, N. A., Bryan, A. L. Jr., Brisbin, I. L. Jr., del Lama, S. N., Glenn, T. C. (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 563–566.
- Torres, C. R., Ogawa, L. M., Gillingham, M. A. F., Ferrari, B., van Tuinen, M. (2014): A multi-locus inference of the evolutionary diversification of extant flamingos (Phoenicopteridae). *BMC Evolutionary Biology*, 14.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Van den Bussche, R. A., Harmon, S. A., Baker, R. J., Bryan, A. L. Jr., Rodgers, J. A. Jr., Harris, M. J., Brisbin, I. L. (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the Wood Stork (*Mycteria americana*). *The Auk*, 116, 1083–1092.
- Van Tuinen, M., Butvill, D. B., Kirsch, J. A. W., Hedges, S. B. (2001): Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proceedings of the Royal Society London B, Biological Sciences*, 268, 1345–1350.
- Veselovský, Z. (2001): *Obecná ornitologie*. Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 581–584.
- Zaccara, S., Crosa, G., Vanetti, I., Binelli, G., Childress, B., McCulloch, G., Harper, D. M. (2011): Lesser Flamingo *Phoeniconaias minor* as a nomadic species in African



shallow alkaline lakes and pans: genetic structure and future perspectives. Ostrich, 82, 95–100.