

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu
trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*)**

Bakalářská práce

Denisa Janušová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

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

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

V Olomouci dne 31.7. 2015

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a odborné vedení při zpracování teoretické i experimentální části mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci.

Souhrn

V této bakalářské práci jsem se zabývala testováním mikrosatelitových lokusů izolovaných od zástupců řádu trubkonosí na polymorfismus u potápky roháče (*Podiceps cristatus*) za použití *cross-species* PCR amplifikace.

V teoretické části jsem se věnovala celkovému popisu řádu potápky (Podicipediformes), zařazení řádu do systému, jeho rozdělení na jednotlivé druhy, výskytu těchto druhů a dále podrobnému popisu potápky roháče. Dále jsem se zabývala teoretickým zpracováním mikrosatelitů, jejich výskytem, mutacemi, izolací *de novo* a *cross-species* PCR amplifikací. V literárním přehledu jsem popsala doposud objevené mikrosatelity izolované od zástupců řádu trubkonosí, přičemž jsem se zaměřila na jednotlivé metody a postupy při izolaci těchto mikrosatelitových lokusů a výsledky týkající se jejich polymorfismu.

V experimentální části jsem testovala 213 párů primerů na *cross-species* PCR amplifikaci u potápky roháče. Pro tyto účely jsem použila genomickou DNA od šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče a na polymorfismus jsem testovala 207 doposud publikovaných párů primerů izolovaných od 19 druhů z řádu trubkonosí a šest dalších párů primerů od zástupců řádů dlouhokřídlí a pěvci, které jiní autoři úspěšně použili u trubkonosých.

Pomocí *cross-species* PCR amplifikace s DNA šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče a následné elektroforetické separace jsem u potápky roháče našla celkem 20 polymorfních mikrosatelitů se dvěma až osmi alelami, přičemž 13 z nich pocházelo od zástupců čeledi buňňákovití, čtyři mikrosatelity od zástupců čeledi albatrosovití a tři mikrosatelity od zástupců čeledi buňňáčkovití. U polymorfních mikrosatelitů jsem určila optimální teplotu nasedání primerů, koncentraci hořčnatých iontů v PCR mixu a délku elektroforetické separace.

Summary

I dealt in my bachelor thesis with testing microsatellite loci for polymorphism in Crested Grebe (*Podiceps cristatus*) isolated from representatives of Procellariiformes, using the method of *cross-species* PCR amplification.

In the theoretical part I described Podicipediformes, including the order into the system, its breakdown by species, the occurrence of these species, as well as detailed descriptions of the Crested Grebe. Then I dealt with the theoretical treatment of microsatellites, their occurrence, mutations, isolation *de novo* and *cross-species* PCR amplification. Also, I described previously discovered microsatellite isolated from representatives of Procellariiformes, while I focused on various methods and processes of the isolation of these microsatellite loci and their polymorphism.

In the experimental part I tested *cross-species* PCR amplification of 213 primer pairs in Crested Grebe. I used genomic DNA from six unrelated individuals of Crested Grebe and I tested 207 so far published primer pairs isolated from 19 species from the Procellariiformes and six other primer pairs from representatives of Charadriiformes and Passeriformes that other authors found polymorphic in Procellariiformes.

Using the method of *cross-species* PCR amplification with DNA of six unrelated individuals of Crested Grebe and subsequent electrophoretic separation, I found a total number of 20 polymorphic microsatellites with two to eight alleles, while 13 of them were from representatives of Procellariidae, 4 of them from representatives of Diomedidae and 3 microsatellites from representatives of Hydrobatidae. For polymorphic microsatellite I determined the optimal *annealing* temperature, the concentration of magnesium ions in the PCR mix and the length of the electrophoretic separation.

Obsah

1.	Úvod.....	7
2.	Cíle práce	8
3.	Literární přehled	9
3.1.	Řád potápky	9
3.1.1.	Potápka roháč.....	11
3.2.	Mikrosatelity	12
3.2.1.	<i>Cross-species</i> PCR amplifikace mikrosatelitů.....	13
3.2.2.	Mikrosatelity popsané u druhů z řádu trubkonosí	14
3.2.2.1.	Mikrosatelity popsané u druhů z čeledi albatrosovití	14
3.2.2.2.	Mikrosatelity popsané u druhů z čeledi buňňákovití.....	16
3.2.2.3.	Mikrosatelity popsané u druhů z čeledi buňňáčkovití.....	22
4.	Materiál a metody	25
4.1.	Biologický materiál.....	25
4.2.	Amplifikované mikrosatelity u potápky roháče.....	25
4.2.1.	PCR amplifikace	28
4.2.2.	Elektroforetická separace PCR produktů.....	30
4.3.	Seznam použitých chemikálií	32
4.4.	Seznam použitých roztoků.....	33
4.5.	Seznam použitých laboratorních přístrojů	35
5.	Výsledky	36
6.	Diskuze	43
7.	Závěr	53
8.	Seznam použitých zkratk	54
9.	Použitá literatura	55

1. Úvod

Mikrosatelity jsou repetitivní sekvence nacházející se ve všech prokaryotických i eukaryotických organismech. Čím více obsahují repetitivních jednotek, tím větší je pravděpodobnost vzniku mutací a tedy větší polymorfismus. Mikrosatelity jsou obvykle izolovány *de novo* nebo jsou testovány na *cross-species* PCR amplifikaci u druhů fylogeneticky příbuzných. Díky svému vysokému stupni polymorfismu se mikrosatelity využívají jako markery při studiích fylogenetické příbuznosti, genetickém mapování, identifikaci jedinců nebo při populačně genetických studiích.

V této bakalářské práci se budu věnovat testování mikrosatelitových lokusů u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Tato práce spočívá v hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů u výše uvedeného druhu pomocí *cross-species* PCR amplifikace doposud publikovaných primerů izolovaných od zástupců řádu trubkonosí a několika dalších mikrosatelitových lokusů nalezených u zástupců řádů dlouhokřídli a pěvci, které byly polymorfní u trubkonosých.

2. Cíle práce

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

3. Literární přehled

3.1. Řád potápky

Potápky (Podicipediformes) jsou vodní ptáci o velikosti menší kachny s tělem přizpůsobeným k plavání i potápění (Gaisler *et Zima*, 2007). Typickým znakem potápek je noha s prsty opatřenými kožovitým lemem, která je plochá, velmi pružná a umožňuje rychlost a obratnost při pohybu ve vodě (Fjeldsá, 1994). Jejich opeření je jemné a velmi husté a to zejména na břišní straně – krycí pera mají spirálovité paprsky a pera rýdovací jsou značně zkrácena (Gaisler *et Zima*, 2007). Samice i samci si jsou velmi podobní, liší se zejména hlasy, které vydávají. Mnoho druhů se vyznačuje pestrým zbarvením a vztyčitelnými pérovými límci. Zbarvení a vydávané zvuky hrají významnou roli při toku (Fjeldsá, 2004).

Tito ptáci tráví téměř celý život ve vodě, kde také stavějí svá hnízda z rostlinného materiálu, mimo ni chodí poměrně obtížně (Gaisler *et Zima*, 2007). Jejich způsob života souvisí také s málo pneumatizovanou kostrou. Jelikož křídla mají úzká a krátká, potřebují se před vzletem nejprve rozběhnout po hladině (Šťastný *et al.*, 1998). Kostrční žlázu mají mohutnou a porostlou peřím (Hudec *et al.*, 1972). Některé druhy létají velice rychle, ale v tomto směru jim chybí obratnost a právě z tohoto důvodu jsou častou potravou dravců. Některé potápky žijící v teplých oblastech, kde nedochází k zamrznání vodních ploch, zcela schopnost létání ztratily (Fjeldsá, 1994).

Jejich vejce mají bílou barvu a jsou zahřívána oběma rodiči. Mláďata se líhnou postupně, jelikož potápky zahřívají již první snesené vejce (Fjeldsá, 2004). O mláďata se starají oba rodiče a jsou schopna plavat ihned po narození, avšak ze začátku sedí na zádech rodičů z důvodu menší odolnosti proti chladu (Fjeldsá, 1994). Mláďatům je potrava lovena i podávána do zobáků, později pouze lovena, a proto jsou označovány jako polokrmivá (Fjeldsá, 2004).

Potápky polykají vlastní peří, které může vytvořit „zátku“ v pylorickém žaludku. Pravděpodobně se tak děje z důvodu ochrany žaludku proti ostrým rybím kostem. Následně jsou nestrávené zbytky potravy i s peřím vyvrhovány (Fjeldsá, 2004).

Jednotlivé druhy potápek se od sebe liší typem potravy: Potápky menšího vzrůstu žijí většinou osamoceně a živí se hmyzem a menšími rybami, pro větší druhy jsou potravou ryby, jiné potápky s menším zobákem jsou naopak specializované na lov drobných členovců, tedy typ potravy je dán tvarem a velikostí zobáku. Druhy živící se

rybami obvykle žijí a také loví samostatně, zatímco ostatní jsou spíše sociální (Fjeldså, 1994).

Gaisler *et Zima* (2007) zařazují čeleď potápkovitých do systému následovně:

Říše:	živočišná (Animalia)
Kmen:	strunatci (Chordata)
Podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
Třída:	ptáci (Aves)
Řád:	potápky (Podicipediformes)
Čeleď:	potápkovití (Podicipedidae)

Počet druhů uváděných různými autory v rámci čeledi potápkovití kolísá. Hudec *et al.* (1972) řadí do čeledi 22 druhů, přičemž Gosler *et al.* (1994) o jeden druh méně. Důvodem odlišných počtů druhů je skutečnost, že jeden z druhů je dnes považován za vyhynulý, a to potápka andská (*P. andinus*). Del Hoyo *et al.* (1992) uvádějí 21 druhů potápek členěných do pěti rodů: Rod *Podiceps* zahrnuje osm druhů: Potápku argentinskou (*P. gallardoi*), černokrkou (*P. nigricollis*), roháče (*P. cristatus*), rudokrkou (*P. grisegena*), stříbřitou (*P. occipitalis*), Taczanovského (*P. taczanowskii*), velkou (*P. major*) a žlutohrou (*P. auritus*). Rod *Poliocephalus* zahrnuje dva druhy: Potápku šedohlavou (*P. poliocephalus*) a novozélandskou (*P. rufopectus*). Do rodu *Aechmophorus* patří potápka Clarkova (*A. clarkii*) a západní (*A. occidentalis*) a do rodu *Podilymbus* patří dva druhy: Potápka šedá (*P. podiceps*) a obrovská (*P. gigas*). Rod *Rollandia* zahrnuje potápku Rollandovu (*R. rolland*) a krátkokřídrou (*R. micropterum*). Poslední rod se nazývá *Tachybaptus* a spadá do něj potápka australská (*T. novaehollandiae*), madagaskarská (*T. pelzelni*), malá (*T. ruficollis*), nejmenší (*T. dominicus*) a skořicovohrdlá (*T. rufolavatus*). Téměř polovina z těchto druhů se vyskytuje v neotropické oblasti rozkládající se na území Jižní a Střední Ameriky, dva druhy obývají oblast Austrálie a další zástupci žijí v Eurasii, Africe nebo na Madagaskaru.

Na území České republiky se vyskytuje 5 druhů potápek (Hudec *et al.*, 1972): Potápka rudokrká hnízdí v České republice vzácně, potápka žlutorohá žije na menších nádržích i větších jezerech a v ČR se vyskytuje nepravidelně, potápka černokrká hnízdí v koloniích na různě velkých vodních plochách, v ČR se její počty stále zmenšují, potápka malá je nejmenší evropskou potápkou živící se hlavně hmyzem a u nás hnízdí pravidelně i na menších vodních plochách. Posledním u nás žijícím druhem je potápka roháč (Hudec *et al.*, 1972), které se věnuji v následujícím textu.

3.1.1. Potápka roháč

Potápka roháč (*Podiceps cristatus*) je největším druhem potápky na našem území, měří na délku kolem 50 cm a váží asi 1,2 kg, samice je menšího vzrůstu (Hudec *et al.*, 1972). Tělo má černohnědé, po stranách červenohnědé. Její krk je poměrně dlouhý, štíhlý a má bílou barvu, hlava ve svatebním šatu nese pernaté růžky, které v zimním období chybějí. Mláďata jsou světlejší s tmavším temenem hlavy a po jejich stranách s tmavými podélnými proužky na bílém podkladu (Šťastný *et al.*, 2006). Dospělý jedinec potápky roháče s mláďaty je na Obr. 1.

Obr. 1: Samice potápky roháče s mláďaty (Zdroj: <https://naturfotografenforum.de/>)



Hlavní potravou potápky roháče jsou menší ryby, hmyz, měkkýši, ale vzácně i žáby a užovky. Potápí se jen do menších hloubek, kde loví většinu své potravy a pod vodou vydrží průměrně půl minuty (Hudec *et al.*, 1972).

Vyskytuje se v Austrálii, jižní Asii, v Africe i v souvislém areálu severní Eurasie. V současnosti je evropská populace charakterizovaná jako zabezpečená a zahrnuje kolem 300 000 párů. Ptáci hnízdící v Evropě většinou zimují na pobřeží Baltského a Severního moře, jde tedy o ptáky tažné (Šťastný *et al.*, 2006). Zimovištěm jedinců hnízdících v ČR je Středomoří mezi Skadarským jezerem a Itálií, vzácně zimují

na našich nezamrzlých vodách. Z hnízdiště odlétají v období září a října a vracejí se na konci března (Šťastný *et al.*, 2006). Tok začíná ihned po příletu ptáků na hnízdiště a skládá se z několika fází, které zahrnují například prudké potřepávání hlavou, zajíždění špičky zobáku do peří v oblasti lopatek nebo těsné přiblížení se hrudí, při němž se ptáci vztyčí na vodě a obvykle drží vodní rostliny v zobáku (Hudec *et al.*, 1972).

Potápka roháč žije zejména na větších sladkovodních nádržích, vzácně potom hnízdí i na slaných vodách (Hudec *et al.*, 1972). Většinou hnízdí jednotlivě, vzácněji pak v koloniích. Hnízda jsou většinou umístěna v rákosí, někdy i na volné hladině a stavějí je obě pohlaví z rostlinného materiálu, vodních řas a bahna. První vejce bývá obvykle sneseno do hnízda, které se ještě ponořuje, takže bývá potopeno ve vodě. Čerstvě snesená vejce mají bílou až namodralou barvu, později se vlivem tlejících rostlin barví do hněda a v sezení na nich se střídají oba rodiče po dobu 25 – 29 dní (Hudec *et al.*, 1972).

3.2. Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou nazývány také jako jednoduché repetitivní sekvence (SSRs, *Simple Sequence Repeats*) a jedná se o tandemově se opakující motivy 1 – 6 bází, které se nacházejí ve všech dosud analyzovaných prokaryotických a eukaryotických organismech (Zane *et al.*, 2002). Rozložení mikrosatelitů v rámci genomu není homogenní, avšak jsou součástí nekódujících i kódujících oblastí. Díky vysokému stupni polymorfismu jsou mikrosatelity využívány jako markery při studiu příbuznosti, při forenzní DNA analýze nebo genetickém mapování (Zhu *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2002).

Mikrosatelitové markery se většinou vyznačují vysokým stupněm mutací, a tedy vysokou úrovní polymorfismu. Množství mutací neboli velikost mutačního tlaku závisí na délce alely – čím větší je množství repetitivních jednotek, tím větší je pravděpodobnost vzniku mutací (Hardy *et al.*, 2003). Lokusy, které mají méně než 5 repetitivních jednotek jsou jen zřídka polymorfní (Zhu *et al.*, 2000). Původ polymorfismu je s největší pravděpodobností způsoben sklouznutím (slippage) DNA polymerázy v průběhu replikace (Schlotterer *et al.*, 1992).

Hlavní nevýhodou je izolace mikrosatelitů *de novo* – u druhů, pro které dosud neproběhly žádné studie mikrosatelitů, je nutné tyto sekvence najít, osekvenovat, navrhnout k nim příslušné primery a zjistit, zda jsou polymorfní. Izolace mikrosatelitových lokusů zahrnuje skríníng genomických knihoven příslušnými sondami (Rassmann *et al.*, 1991). Množství klonů obsahujících mikrosatelity (pozitivní

klony), které lze získat na základě tohoto standardního postupu, se pohybuje v rozmezí od 12 % do méně než 0,04 %. Popsaný postup však není účinný u taxonů s nízkou mikrosatelitovou frekvencí. Z tohoto důvodu dochází ke vzniku modifikovaných postupů izolací, mezi které je možné zařadit hledání nových mikrosatelitů pomocí RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) primerů a po něm následující Southernovy hybridizační metody produktů polymerázové řetězové reakce se sondami mikrosatelitů (Zane *et al.*, 2002).

3.2.1. *Cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou v současné době jedním z nejpoužívanějších typů genetických markerů používaných v molekulárně ekologických studiích. Nástrojem těchto studií jsou univerzální markery, které jsou snadno přenosné mezi jednotlivými druhy (Barbará *et al.*, 2007). Tyto markery usnadňují porovnání mezi úzce příbuznými taxony a napomáhají tak studovat děje probíhající v populacích, jako je například divergence (Noor *et Feder*, 2006). Mikrosatelitové markery nelze používat univerzálně, ale právě mezi blízce příbuznými druhy je PCR amplifikace mikrosatelitů možná (*cross-species* PCR amplifikace).

Existuje mnoho faktorů, které mohou úspěšnost této amplifikace ovlivnit, z nichž hlavním je fylogenetická vzdálenost mezi zdrojovým a cílovým druhem. Čím větší je tato vzdálenost, tím menší úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace se dosáhne (Primmer *et al.*, 1996; Primmer *et al.*, 2005). Podle Ellegren *et al.* (1995) je průměrná délka mikrosatelitového lokusu u druhu zdrojového větší, než průměrná délka stejného mikrosatelitového lokusu u druhu cílového, což je způsobeno občasnými delecemi nebo bodovými mutacemi, ke kterým dochází při *cross-species* PCR amplifikaci a vedou ke vzniku právě již zmíněného kratšího a méně polymorfního mikrosatelitového lokusu.

Dalšími faktory ovlivňujícími úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace jsou způsob rozmnožování a generační doba. Tento jev se projevuje například u samosprašných druhů rostlin, u kterých dochází ke snížení úspěšnosti amplifikace mikrosatelitů vlivem nahromaděných mutací, z důvodu menší efektivní velikosti populace (Higgins *et Lynch*, 2001; Lynch *et Conery*, 2003). Mutace zapříčiněné právě nízkou efektivní velikostí populace zahrnují delecce, bodové mutace nebo chromozomální přestavby. Tedy míra a způsob změn, ke kterým v genomu dochází, je odlišná u rostlin a živočichů (Lim *et al.*, 2007). Byl také zjištěn negativní vliv C hodnoty (velikosti genomu) na míru úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace, tedy

amplifikace je vyšší u těch druhů, u nichž je velikost genomu menší než u druhu zdrojového (Garner, 2002).

V současné době jsou ve vývoji jiné alternativní zdroje mikrosatelitových markerů, které by mohly být snadněji přenosné mezi druhy. Lze mezi ně zařadit např. EST, které se vyskytují v exonech, ale mají nižší variabilitu (Bouck *et Vision*, 2007).

3.2.2. Mikrosatelity popsané u druhů z řádu trubkonosí

Řád trubkonosí (Procellariiformes) zahrnuje asi 110 druhů a je rozdělen do čtyř čeledí: Albatrosovití (Diomedidae), buňňákovití (Procellariidae), buňňáčkovití (Hydrobatidae) a buňňíkovití (Pelecanoididae). V čeledi albatrosovití, do níž patří přibližně čtrnáct druhů, bylo doposud popsáno 53 mikrosatelitů u sedmi druhů. Čeď buňňákovití má 70 druhů, přičemž bylo popsáno 100 mikrosatelitů u devíti druhů. Do čeledi buňňáčkovití patří asi dvacet druhů a doposud bylo izolováno 54 mikrosatelitů od tří druhů. Z čeledi buňňíkovití doposud u žádného druhu nebyly mikrosatelity popsány. Tato čeď obsahuje nejmenší množství druhů, a to čtyři (Gosler *et al.*, 1994).

3.2.2.1. Mikrosatelity popsané u druhů z čeledi albatrosovití

V rámci čeledi albatrosovití bylo doposud popsáno 53 mikrosatelitů u sedmi druhů a to sice u albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), šedohlavého (*D. chrysostoma*), jižního (*D. antipodensis*), černobrvého (*Thalassarche melanophris*), černonohého (*Phoebastria nigripes*), laysanského (*P. immutabilis*) a bělohřbetého (*P. albatrus*) (Burg, 1999; Burg *et Croxall*, 2001; Burg *et Croxall*, 2004; Dubois *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 2014).

U albatrosa šedohlavého a albatrosa stěhovavého našla a charakterizovala Burg (1999) 26 mikrosatelitových lokusů. Genomická DNA od obou druhů albatrosů byla štěpena *AluI* restriční endonukleázou a vybrané fragmenty o velikosti 300 – 800 bp byly ligovány do plazmidu pUC19 a transformovány do bakterií DH5a *Escherichia coli*. Bakteriální kolonie byly prověřovány pomocí (AC)₁₅ syntetických oligonukleotidů. Pozitivní klony byly znovu rozštěpeny, prověřeny a poté sekvenovány. Druhá knihovna pro oba druhy obohacená o AC a CTTT repetice byla sestavena na základě hybridizačního protokolu (Armour *et al.*, 1994). Díky tomuto postupu byl získán 30násobný počet kolonií obsahujících mikrosatelitové lokusy. Poté byly navrženy z 31 mikrosatelitových sekvencí primery, nicméně pouze 26 z nich amplifikovalo PCR

produkt. Mikrosatelitové lokusy byly testovány u albatrosa stěhovavého a šedohlavého, kdy u albatrosa šedohlavého bylo zjištěno sedmnáct polymorfních lokusů se dvěma až deseti alelami a u albatrosa stěhovavého patnáct polymorfních lokusů, přičemž tyto lokusy měly od dvou do jedenácti alel. Mikrosatelity byly dále testovány na *cross-species* PCR amplifikaci u albatrosa černobrvého, kde vykazovalo polymorfismus patnáct lokusů se dvěma až sedmi alelami. Pouze dva lokusy (Dc10 a Dc19) nemplifikovaly PCR produkt u albatrosa stěhovavého, ale u zbývajících dvou druhů ano.

Burg *et* Croxall (2001) se zabývali studiem fylogenetických vztahů albatrosa černobrvého a albatrosa šedohlavého za pomoci mitochondriální DNA a osmi mikrosatelitových markerů již dříve publikovaných (Burg, 1999), přičemž našli jeden nový mikrosatelitový lokus. Vzorky krve byly odebrány téměř 130 jedincům těchto dvou druhů ze šesti ostrovů v Atlantském oceánu, poté byla extrahována DNA pomocí Chelexu, amplifikována a část byla použita na analýzu mitochondriální DNA. Mikrosatelitová variabilita byla testována u výše uvedených druhů albatrosů, přičemž u každého druhu bylo testováno osm mikrosatelitových lokusů izolovaných Burg (1999) a jeden nově izolovaný (De33). Ten byl polymorfní u obou druhů, u albatrosa černobrvého měl tento lokus u různých populací od sedmi do dvanácti alel a u různých populací albatrosa šedohlavého od osmi do 22 alel. Tento lokus je vázán na pohlaví u albatrosa šedohlavého i černobrvého, přičemž o této informaci se autoři nezmiňují, ale je uvedena v článku Burg *et* Croxall (2004). Tři z testovaných lokusů vykazovaly nedostatečnou heterozygotnost, byly to lokus De11 u albatrosa šedohlavého a lokusy Dc26 a Dc27 u albatrosa černobrvého. Všechny ostatní lokusy byly v Hardy-Weinbergově rovnováze.

Fylogenetické vztahy u albatrosa stěhovavého a albatrosa jižního studovali Burg *et* Croxall (2004) použitím osmi mikrosatelitových markerů, které byly izolovány již dříve (Burg, 1999; Burg *et* Croxall, 2001) a mitochondriální DNA. Při tomto studiu došlo k objevení nového mikrosatelitového lokusu. Vzorky krve byly získány od dospělých jedinců těchto tří druhů žijících na sedmi ostrovech v Atlantském oceánu. Genomickou DNA extrahovali pomocí Chelexu, poté ji amplifikovali a část použili na analýzu mitochondriální DNA. Variabilitu mikrosatelitů testovali u obou uvedených druhů albatrosů, kdy u nich shodně testovali po osmi mikrosatelitových lokusech dříve izolovaných Burg (1999) a Burg *et* Croxall (2001) a jeden lokus (De37) izolovaný nově. Ten vykazoval polymorfismus u albatrosa stěhovavého i albatrosa jižního se šesti respektive sedmi alelami. Všechny testované lokusy s výjimkou lokusů Dc16, De11 a De33 byly v Hardy-Weinbergově rovnováze.

Dubois *et al.* (2005) popsali deset mikrosatelitových lokusů pro albatrosa stěhovavého. Vzorky krve odebrali v Pointe Morne (Kerguelovy ostrovy), poté DNA extrahovali za použití QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitové lokusy izolovali z knihovny obohacené o fragmenty obsahující (TG)₁₀ a (TC)₁₀ repetice za použití sond značených biotinem, magnetických kuliček potažených streptavidinem a XL10 Gold ultrakompetentních bakterií *E. coli* (Stratagene). Po osekvenování pozitivních klonů bylo vybráno patnáct mikrosatelitových lokusů pro další PCR amplifikaci. PCR reakce nejprve provedli jednotlivě pro každý lokus a následně je rozdělili do dvou multiplexů. Mikrosatelitové lokusy poté testovali u tří populací po dvaceti jedincích albatrosa stěhovavého a výsledky ukázaly, že jsou tyto lokusy polymorfní se 2 až 13 alelami. Pro výzkum univerzálnosti primerů testovali tyto markery na amplifikaci u dalších tří druhů z čeledi buňňákovití: Buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), šedého (*Calonectris diomedea*) a sněžního (*Pagodroma nivea*). U buňňáka Bulwerova vykazovalo polymorfismus pět lokusů (6A3, 12H8, 10C5, 11H7 a 12C8), u buňňáka sněžního byly polymorfní tři lokusy (12H8, 10C5 a 12C8) a u buňňáka šedého žádný. Počty alel u amplifikovaných lokusů autoři neuvádějí.

Hernandez *et al.* (2014) objevili a charakterizovali patnáct polymorfních mikrosatelitových lokusů se dvěma až osmnácti alelami na lokus u tří druhů albatrosů: Albatrosa černonohého, laysanského a bělohřbetého. Extrahovali DNA ze svalové tkáně 51 jedinců reprezentujících tyto tři druhy albatrosů použitím QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Sestavili genomové knihovny pomocí NEBNext Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina a NEBNext Multiplex Oligos for Illumina. Vybrali 44 lokusů obsahujících di-, tri- nebo tetranukleotidové repetice, ke kterým pomocí softwaru Primer3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) navrhli primery a z těchto lokusů jich použili pouze šestnáct pro další PCR amplifikaci. PCR provedli nejprve samostatně pro každý lokus, následně ve dvou multiplexech a poté testovali tyto lokusy u tří druhů albatrosů na polymorfismus. Z šestnácti testovaných lokusů jich bylo třináct polymorfních u albatrosa černonohého se dvěma až osmnácti alelami, stejný počet polymorfních lokusů byl nalezen u albatrosa laysanského se dvěma až čtrnácti alelami a čtrnáct lokusů vykazovalo polymorfismus u albatrosa bělohřbetého se dvěma až sedmi alelami. Všechny lokusy byly v Hardy-Weinbergově rovnováze a žádné dva nebyly ve vazbě.

3.2.2.2. Mikrosatelity popsané u druhů z čeledi buňňákovití

Z čeledi buňňákovití bylo izolováno 100 mikrosatelitů od devíti druhů: Buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), šedého (*Calonectris diomedea*), taiko

(*Pterodroma magentae*), baleárského (*Puffinus mauretanicus*), světlonohého (*P. carneipes*), trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*), Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), havajského (*P. sandwichensis*) a útlozobého (*Pachyptila belcheri*) (Techow *et O’Ryan*, 2004; Bried *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2008; Lawrence, 2008; Brown *et Jordan*, 2009; Andris *et al.*, 2010; Welch *et Fleischer*, 2011; Hardesty *et al.*, 2012; Quillfeldt *et al.*, 2012; Moodley *et al.*, 2015).

Šest polymorfních mikrosatelitových lokusů bylo izolováno a charakterizováno Techow *et O’Ryan* (2004) u buřňáka bělobradého. DNA byla získána z tkáně pomocí fenol-chloroformové extrakce a následného srážení ethanolem. Genomová knihovna obohacená o CA repetice byla vytvořena z DNA pěti jedinců buřňáka bělobradého a následovala PCR amplifikace s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP-PCR). Tato metoda umožňuje získání souboru fragmentů DNA o velikostech od stovek bází až po více než deset kilobází. Obohacené fragmenty byly klonovány použitím Promega pGEM-T-Easy Vector System, uchovávány na selektivním médiu obsahujícím ampicilin a X-gal a další postup zahrnoval odběr bílých kolonií, přenesení na hybridizační membránu, testy na inzerty pomocí γ -³²P značené CA sondy a následnou amplifikaci pozitivních klonů. Z 21 sekvenovaných rekombinantních plazmidů jich osmnáct obsahovalo mikrosatelity. Pro deset mikrosatelitů byly navrženy primery za pomoci nichž byla DNA amplifikována. Šest z deseti lokusů bylo polymorfních se třemi až devíti alelami. Testy Hardy-Weinbergovy rovnováhy neprokázaly odchýlení lokusů a žádné dva lokusy nebyly ve vazbě. Dále autoři testovali *cross-species* PCR amplifikaci u dalších šesti druhů z čeledi buřňákovití a albatrosovití: Buřňáka tristsanského (*Procellaria conspicillata*), obrovského (*Macronectes giganteus*), Hallova (*M. halli*), albatrosa stěhovavého, šedohlavého a černobrvého. Lokus Paequ4 nevykazoval polymorfismus u buřňáka tristsanského, zbylých šest lokusů bylo polymorfních, u buřňáka obrovského byly polymorfní čtyři lokusy (Paequ3, Paequ4, Paequ7 a Paequ10) a jeden lokus (Paequ13) neamplifikoval PCR produkt. Co se týče buřňáka Hallova, zde byly polymorfní lokusy tři (Paequ3, Paequ4 a Paequ10), jeden neamplifikoval PCR produkt (Paequ13), u albatrosa černobrvého projevíly polymorfismus 4 lokusy (Paequ2, Paequ3, Paequ10 a Paequ13) a u jednoho (Paequ4) nedošlo k amplifikaci PCR produktu. Druhý největší počet polymorfních lokusů a to pět (Paequ2, Paequ3, Paequ8, Paequ10 a Paequ13) byl u albatrosa šedohlavého, kde také jeden z lokusů nebyl amplifikován (Paequ7) a pouze jeden lokus byl polymorfní (Paequ2) u albatrosa stěhovavého, zbylých šest lokusů neamplifikovalo PCR produkt.

U buřňáka šedého objevili Bried *et al.* (2008) jedenáct mikrosatelitových lokusů. Od jedinců z populace žijící na Azorském souostroví odebrali krev, ze které následně

extrahovali DNA za použití QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitové lokusy izolovali z knihovny obohacené o fragmenty, které obsahovaly (GCC)₆, (TA)₁₀, (CG)₁₀ a (TG)₁₀ repetice za pomoci biotinem značených sond, streptavidinem potažených magnetických kuliček a XL10 Gold ultrakompetentních bakterií *E. coli* (Stratagene). Po osekvenování pozitivních klonů bylo vybráno patnáct lokusů s největším počtem repetic pro další PCR amplifikaci. PCR byla provedena odděleně pro každý lokus a následovaly multiplexové PCR pro 3 skupiny lokusů a samostatně pro lokus Cd10. Variabilita byla testována u 43 jedinců buřňáka šedého, kdy se u jedenácti z patnácti lokusů projevil polymorfismus se dvěma až osmi alelami, u dvoualelového lokusu Cd4 byli všichni ptáci homozygoti, což naznačuje, že tento lokus by mohl být vázaný na pohlaví. Testy Hardy-Weinbergovy rovnováhy neukázaly odchylku lokusů, tedy pokud jsou přítomny nulové alely, mají nízkou frekvenci. Autoři testovali mikrosatelitní DNA primery na *cross-species* PCR amplifikaci u dalších tří druhů z čeledi buřňákovití a albatrosovití: Buřňáka Bulwerova, bělobradého a albatrosa stěhovavého, kdy většina lokusů byla polymorfni u buřňáka Bulwerova, pouze dva lokusy (Cd9 a Cd2) byly polymorfni u buřňáka bělobradého a žádný lokus nevykazoval polymorfismus u albatrosa stěhovavého. Počty alel u amplifikovaných lokusů autoři neuvádějí.

Gonzalez *et al.* (2008) izolovali deset polymorfni mikrosatelitových lokusů u buřňáka baleárského. Genomická DNA byla extrahována z krve pomocí fenol-chloroformové extrakce, poté rozštěpena restričními enzymy *RsaI* a *XmnI* a ligována do univerzálních SNX linkerů. Ligovaný produkt byl hybridizován se směsí biotinylovaných CA a AAAG sond a poté byla DNA izolována použitím magnetických kuliček. Následně DNA amplifikovali, ligovali do pGEM-T vektoru a transformovali do bakterií *E. coli*. Sestavili genomovou knihovnu čítající 108 klonů, z nichž pro 23 byly navrhnuty primery. Polymorfismus byl testován u 55 jedinců buřňáka baleárského ze dvou lokalit na Baleárských ostrovech, přičemž polymorfismus vykazovalo deset mikrosatelitových lokusů se dvěma až deseti alelami. U lokusu Puff Sma6 bylo zjištěno, že je vázaný na pohlaví, všechny ostatní lokusy byly v Hardy-Weinbergově rovnováze a žádné dva nebyly ve vazbě. Dále autoři otestovali tyto mikrosatelity na *cross-species* PCR amplifikaci u buřňáka středomořského (*Puffinus yelkouan*), kde jeden lokus (Puff G2F) nevykazoval polymorfismus, ostatní byly polymorfni se dvěma až devíti alelami.

Dva mikrosatelitové lokusy izolovala Lawrence (2008) u buřňáka taiko. Vzoroky krve odebrala 145 jedincům, ze kterých extrahovala DNA. Sestavila genomovou knihovnu obohacenou o GT, GA, AAT, AAAG a GATA repetice. Celkem 2016 klonů bylo testováno na přítomnost inzertů obsahujících mikrosatelity použitím ³²P. Pozitivní klony sekvenovala a pro devět z nich navrhla primery. Následně testovala variabilitu

mikrosatelitových lokusů u téměř 200 jedinců buňáka taiko, přičemž dva lokusy (Tch6 a Tch25) byly polymorfní se dvěma respektive čtyřmi alelami. Dále testovala 22 mikrosatelitových lokusů již dříve izolovaných u buňáka bělobradého (Techow *et* O’Ryan, 2004), albatrosa stěhovavého (Burg, 1999) a u racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) (Given *et al.*, 2002), který patří do řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) na *cross-species* PCR amplifikaci. Šest z 22 testovaných lokusů bylo u buňáka taiko polymorfních se dvěma až devíti alelami, přičemž dva z těchto lokusů (RBG18 a RBG29) pocházely od racka novozélandského a měly dvě a pět alel.

Brown *et* Jordan (2009) izolovali šest mikrosatelitových lokusů u buňáka trinidadského. Vzorky tkáně byly odebrány ptákům z populace žijící na Kulatém ostrově (Indický oceán), z nich byla izolována DNA použitím fenol-chloroformové extrakce a mikrosatelitové lokusy byly izolovány z genomové knihovny obohacené o CA a CAGA repetice. Produkty ligace byly amplifikovány, obohacené fragmenty byly klonovány pomocí TA Cloning Kit (Invitrogen) a poté byly testovány pozitivní klony na přítomnost inzertů obsahujících výše uvedené repetice. Plazmidy s těmito inzerty sekvenovali a navrhli pro ně primery použitím softwaru Primer3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). PCR byla provedena nejprve samostatně pro každý lokus, poté PCR multiplexové a šest mikrosatelitů bylo poté testováno na polymorfismus, přičemž tři z těchto lokusů (Parm01, Parm02 a Parm03) byly polymorfní se čtyřmi až deseti alelami. Pro studium univerzálnosti primerů byly tyto markery dále testovány u dalších sedmnácti druhů z řádu trubkonosí konkrétně z čeledi albatrosovití a buňákovití a dále u jednoho druhu tučňáka, a to tučňáka žlutonohého (*Eudyptes chrysolophus*). Lokus Parm01 byl polymorfní u dvanácti z těchto druhů, lokus Parm02 pouze u pěti druhů včetně tučňáka žlutorohého, co se týče lokusů Parm03 a Parm06, zde byl zjištěn polymorfismus pouze u šesti druhů pro každý z nich, kdy lokus Parm03 neamplifikoval PCR produkt u pěti druhů. Lokus Parm04 neamplifikoval PCR produkt u devíti druhů, u dalších tří druhů byl polymorfní a u tří druhů byl polymorfní lokus Parm05, který u dalších čtrnácti druhů neamplifikoval PCR produkt. Počty alel polymorfních lokusů u těchto osmnácti druhů se pohybovaly od dvou do devíti. Testy Hardy-Weinbergovy rovnováhy ukázaly odchylku u lokusu Parm02, který pravděpodobně obsahoval nulové alely, všechny ostatní lokusy se neodchylovaly a žádné nebyly ve vazbě. Buňák trinidadský byl také testován na *cross-species* PCR amplifikaci pomocí primerů navržených pro 53 mikrosatelitů izolovaných od jiných druhů ptáků: Buňáka bělobradého (Techow *et* O’Ryan, 2004), albatrosa stěhovavého (Burg, 1999; Dubois *et al.*, 2005) a kulíka mořského (*Charadrius alexandrinus*) (Küpper *et al.*, 2007), který patří do řádu dlouhokřídlí. Šest z těchto *cross-species* lokusů bylo u buňáka

trinidatského polymorfních se dvěma až pěti alelami, přičemž jeden z těchto lokusů (Calex-01) pocházel od kulíka mořského a měl čtyři alely.

Andris *et al.* (2010) objevili jedenáct mikrosatelitových lokusů se dvěma až osmi alelami u buňáka Bulwerova. Krev odebrali buňákům žijícím na Azorském souostroví a následně extrahovali jejich DNA pomocí QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitové lokusy byly izolovány z knihovny obohacené o fragmenty obsahující (TG)₁₀ a (TC)₁₀ repetice s použitím biotinem značených sond, streptavidinem potažených magnetických kuliček a JM 09 vysoce kompetentních bakterií *E. coli* (Promega). PCR provedli nejprve samostatně pro každý lokus a poté tyto lokusy rozdělili do tří skupin se kterými udělali PCR multiplexové. Variabilitu testovali u 91 dospělých jedinců, kdy z 25 lokusů se u 24 projevil polymorfismus, ale pouze jedenáct z nich bylo vybráno, protože ostatní nevykazovaly dostatečnou heterozygotnost. U lokusu Bb11 bylo zjištěno, že je vázaný na pohlaví. Autoři testovali tyto mikrosatelity na *cross-species* PCR amplifikaci u dalších tří druhů zastupujících čeledi buňákovití a buňáčkovití: Buňáka modravého (*Halobaena caerulea*), buňáka bělobradého a buňáčka Monteirova. U buňáka bělobradého bylo polymorfních šest lokusů, u buňáka modravého vykazovalo polymorfismus jedenáct lokusů a jeden lokus neamplifikoval PCR produkt a u buňáčka Monteirova bylo polymorfních pět lokusů a dva lokusy neamplifikovaly PCR produkt. Počty alel u polymorfních lokusů autoři neuvádějí.

U ohroženého druhu, buňáka havajského našli Welch *et* Fleischer (2011) deset mikrosatelitových lokusů. Mikrosatelity obohacené genomové knihovny byly sestaveny podle Hamilton *et al.* (1999). Genomická DNA byla extrahována ze vzorků tkání jednoho samce a jedné samice buňáka havajského, následně rozštěpena na fragmenty o velikosti 200 – 1000 bp, ligována do SNX linkerů a poté amplifikována. Ligovaný produkt hybridizovali se směsí oligonukleotidových sond: (CA)₁₀, (AAAG)₅, (AAAC)₅ a (AGAGG)₅, znovu amplifikovali, vložili do pBluescript II SK+ plazmidů a poté transformovali do ultrakompetentních bakterií *E. coli*. Následně sestavili genomovou knihovnu, provedli PCR a vybrali 65 klonů obsahujících více než sedm dinukleotidových repetice nebo více než pět tetranukleotidových nebo pentanukleotidových repetice. Nicméně jedenáct z těchto klonů obsahovalo příměsí oligonukleotidů použitých při hybridizaci a z toho důvodu byly vyloučeny z dalšího testování. Pomocí softwaru Primer3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000) byly navrženy primery pro zbylých 54 klonů a poté byly testovány na polymorfismus, kdy deset lokusů bylo polymorfních se třemi až deseti alelami. Testy Hardy-Weinbergovy rovnováhy ukázaly odchýlení lokusu Ptero06, který pravděpodobně obsahoval nulové alely, všechny ostatní lokusy byly v rovnováze a nebyla mezi nimi prokázána žádná vazba. Nebyl zjištěn

žádný lokus vázaný na pohlaví. Navíc autoři testovali 37 již dříve publikovaných párů primerů, včetně všech lokusů izolovaných od buřňáka šedého (Bried *et al.*, 2008), trinidadského (Brown *et al.*, 2009), baleárského (Gonzalez *et al.*, 2008), bělobradého (Techow *et al.*, 2004), albatrosa stěhovavého (Burg, 1999) z čeledi albatrosovití, racka novozélandského (Given *et al.*, 2002) patřícího do řádu dlouhokřídlí a lesňáčka žlutonohého (Dawson *et al.*, 1997) z řádu pěvci na *cross-species* PCR amplifikaci u buřňáka havajského, přičemž deset z těchto lokusů bylo polymorfních se třemi až čtrnácti alelami. Dva z těchto deseti polymorfních lokusů (RBG18M a RBG29) pocházely od racka novozélandského a měly pět a čtrnáct alel. Žádný lokus izolovaný od lesňáčka žlutonohého nebyl u buřňáka havajského polymorfní.

U buřňáka světlého studovali Hardesty *et al.* (2012) genetickou variabilitu a diverzitu populace, přičemž našli jedenáct polymorfních mikrosatelitových lokusů. Genomická DNA byla extrahována ze vzorků krve nebo peří 46 jedinců žijících na ostrově Lorda Howa (Nový Jižní Wales), dvaceti jedinců tohoto druhu obývajících Nový Zéland, pěti jedinců ze západní Austrálie a třinácti mrtvých ptáků neznámého původu vylovených rybáři, následně byla rozštěpena sedmi restrikčními enzymy, fragmenty o velikosti 300 – 750 bp byly zachyceny biotinylovanými magnetickými kuličkami a ligovány do pUC19 plazmidu. Pozitivní klony obsahující mikrosatelity byly vybrány náhodně, sekvenovány a lokusy amplifikovány. Variabilita mikrosatelitových lokusů byla testována u devadesáti jedinců buřňáka světlého, kdy jedenáct lokusů bylo polymorfních se třemi až třinácti alelami a žádný lokus nebyl vázaný na pohlaví. Dva lokusy (PcA107 a PcA115) se odchylovaly od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a žádné lokusy nebyly ve vazbě.

Quillfeldt *et al.* (2012) studovali mimopárovou paternitu u buřňáka útlozobého. Vzorky krve a peří byly odebrány od dospělých jedinců i mláďat na Falklandských ostrovech, ze kterých byla extrahována DNA použitím DNeasy Tissue Kit (QIAGEN). PCR amplifikaci, izolaci mikrosatelitů a klonování provedli podle Klauke *et al.* (2009), přičemž sedm z testovaných párů primerů amplifikovalo vysoce kvalitní PCR produkt, který ukázal polymorfismus u deseti vybraných jedinců. Výsledkem byla charakteristika sedmi mikrosatelitů, z nichž dva nebyly použité pro analýzu paternity (Patbel2 a Patbel5). V případě Patbel5 bylo zjištěno, že se s největší pravděpodobností nachází na Z-chromozomu, tedy je vázaný na pohlaví.

Moodley *et al.* (2015) izolovali 25 polymorfních mikrosatelitových lokusů u buřňáka útlozobého. Vzorky krve, peří a svalové tkáně byly odebrány ze sedmi různých populací buřňáků žijících na dílčích subantarktických ostrovech a poté z nich byla extrahována DNA použitím QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitové lokusy

byly izolovány z genomové knihovny obohacené o fragmenty, které obsahovaly CT a GT tandemové repetice za pomoci biotinem značených oligonukleotidových sond a streptavidinem potažených magnetických kuliček. Bylo vybráno 517 klonů obsahujících nejméně šest trinukleotidových nebo tetranukleotidových repetic nebo alespoň deset dinukleotidových repetic, ale pro návržení primerů jich bylo vhodných pouze 166, z nichž autoři dále testovali 36. Variabilita mikrosatelitových lokusů byla testována u buřňáka útlozobého, kdy 25 lokusů bylo polymorfních s pěti až 48 alelami a nebyla zjištěna vazba žádného z lokusů na pohlaví. Poté autoři testovali těchto 25 mikrosatelitových lokusů izolovaných od buřňáka útlozobého i na *cross-species* PCR amplifikaci u dalších pěti druhů z čeledi buřňákovití: Buřňáka holubího (*Pachyptila desolata*), širokozobého (*P. vittata*), hrdliččího (*P. turtur*), Salvinova (*P. salvini*), modravého (*Halobaena caerulea*) a buřňáčka oceánského (*Oceanites oceanicus*) z čeledi buřňáčkovití. U buřňáka holubího bylo polymorfních všech 25 lokusů s pěti až 51 alelami, u buřňáka širokozobého vykazovalo polymorfismus také všech 25 mikrosatelitových lokusů se dvěma až 39 alelami. Co se týče buřňáka hrdliččího, 24 lokusů bylo polymorfních se dvěma až deseti alelami, jeden lokus (Pacbel_03731) polymorfismus nevykazoval. Všech 25 mikrosatelitových lokusů bylo polymorfních u buřňáka Salvinova s pěti až 22 alelami i u buřňáka modravého se dvěma až 36 alelami, zatímco u buřňáčka oceánského dva lokusy (Pacbel_03731 a Pacbel_19907) neamplifikovaly PCR produkt, osm lokusů nevykazovalo polymorfismus a zbývajících patnáct lokusů bylo polymorfních se dvěma až pěti alelami.

3.2.2.3. Mikrosatelity popsané u druhů z čeledi buřňáčkovití

Doposud bylo izolováno 54 mikrosatelitových lokusů od tří druhů z čeledi buřňáčkovití: buřňáčka Monteirova (*Oceanodroma monteiroi*), madeirského (*O. castro*) a dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*) (Sun *et al.*, 2009; Bicknell *et al.*, 2011; Bried *et al.*, 2012).

Pro tři druhy: Buřňáčka Monteirova, madeirského a dlouhokřídlého objevili Sun *et al.* (2009) deset mikrosatelitových lokusů. Genomové knihovny vytvořili ze sedmi zmrazených vzorků krve jedinců buřňáčka madeirského z Japonska podle (Friesen *et al.*, 2007) s použitím klonování (Glenn *et al.*, 2005), kdy DNA štěpili restrikcí enzymem *AluI* na fragmenty o velikosti 200 – 1200 bp. Fragmenty defosforylovali, vyčistili pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) a navázali na univerzální SNX linkery. Ligovaný produkt hybridizovali se směsí tří biotinylovaných

oligonukleotidových sond: (AC)₁₃, (AG)₁₃ a (GAA)₈ a následně DNA izolovali pomocí streptavidinem potažených magnetických kuliček. Poté DNA amplifikovali použitím SNX-F primerů, ligovali do vektoru PCR 2.1-TOPO (Invitrogen) a transformovali do bakterií *E. coli*. Bakteriální kolonie pěstovali na agaru s ampicilinem. Poté sestavili genomovou knihovnu čítající 96 klonů, vybrali 46 klonů obsahujících devět nebo více repetitivních sekvencí, navrhli pro ně primery a provedli PCR. Pro vytvoření genomové knihovny také přispěly další zmrazené vzorky krve buňňáčka dlouhokřídlého – sekvenovali 21 klonů, z nichž pouze dva obsahovaly devět nebo více repetitivních jednotek a opět pro ně navrhli primery. Variabilitu těchto lokusů testovali na 27 vzorcích od buňňáčka madeirského, 22 vzorcích buňňáčka Monteirova a 24 vzorcích od buňňáčka dlouhokřídlého. U buňňáčka Monteirova bylo polymorfních devět lokusů se dvěma až osmi alelami, jeden lokus Oc49 nevykazoval polymorfismus u buňňáčka madeirského, ostatních devět lokusů bylo u tohoto druhu polymorfních se dvěma až jedenácti alelami a co se týče buňňáčka dlouhokřídlého, u něj vykazovalo polymorfismus osm z deseti lokusů se dvěma až devíti alelami. Pozorovaná heterozygotnost dosahovala vyšších než předpokládaných hodnot pro lokus Oc51 u obou druhů z důvodu možné nespecifické amplifikace. Těchto deset mikrosatelitů testovali autoři také na *cross-species* PCR amplifikaci u buňňáčka galapážského (*O. tethys*) a kroužkového (*O. hornbyi*) a u buňňáka havajského, kde produkty PCR amplifikace byly získány pro všechny lokusy u všech druhů kromě lokusů Oc64B a Oc79. Údaje o polymorfismu amplifikovaných lokusů ani počty alel autoři neuvádějí.

Bicknell *et al.* (2011) popsali 26 mikrosatelitových lokusů u buňňáčka dlouhokřídlého. Krev odebrali z populace ptáků na Gull Island (Newfoundland, Kanada) a následně z ní extrahovali genomickou DNA použitím srážecí metody octanem amonným. Genomová knihovna byla obohacena o GT, CT, GTAA, CTA, TTTC a GATA repeticí. Poté bylo testováno téměř 200 klonů na přítomnost těchto inzertů, pozitivní klony byly sekvenovány, pro 50 z nich byly navrhnuty primery použitím softwaru Primer3 (Rozen *et al.*, 2000) a následně byly lokusy testovány na polymorfismus. Z 50 lokusů jich bylo 25 polymorfních se dvěma až 21 alelami, dva lokusy (Ole12 a Ole26) byly vázané na pohlaví a lokus Ole20 nebyl polymorfní. Testy Hardy-Weinbergovy rovnováhy ukázaly, že lokus Ole19 se od ní odchyluje. Dále autoři testovali na *cross-species* PCR amplifikaci u buňňáčka dlouhokřídlého 47 již dříve izolovaných lokusů s primery od buňňáčka madeirského (Sun *et al.*, 2009), zebříčky pestré (*Taeniopygia guttata*) z řádu pěvců (Passeriformes) (Dawson *et al.*, 2010) a sovy pálené (*Tyto alba*) z řádu sovy (Strigiformes) (Klein *et al.*, 2009). Patnáct z těchto lokusů bylo polymorfních, z toho čtyři lokusy izolované od buňňáčka madeirského a

jedenáct od žebříčky pestré, se dvěma až deseti alelami. Žádný z lokusů izolovaných od sovy pálené polymorfismus nevykazoval. Lokus TG05-053 izolovaný od žebříčky pestré se odchyloval od Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

U buňháčka Monteirova našli a charakterizovali Bried *et al.* (2012) osmnáct mikrosatelitových lokusů. Krev byla odebrána ptákům z ostrova Praia (Kapverdské ostrovy), poté extrahována DNA použitím QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Z genomových knihoven byly izolovány mikrosatelitové lokusy, osekvenovány podle Meglècz *et al.* (2010) a Malausa *et al.* (2011) a bylo vybráno 27 sekvencí o velikosti 80 – 469 bp a současně obsahujících více než pět repetitivních jednotek, z nichž bylo použito pouze osmnáct lokusů pro další PCR amplifikaci, jelikož ostatní nevykazovaly dostatečnou heterozygotnost. PCR byla provedena nejprve jednotlivě pro každý z lokusů a poté multiplexně pro tři mikrosatelitové sady. Variabilita těchto lokusů byla zkoumána u 125 dospělých jedinců buňháčka Monteirova a výsledky ukázaly osmnáct polymorfních lokusů se čtyřmi až sedmnácti alelami, lokus Omn23 byl vázaný na pohlaví a snížený podíl heterozygotů byl pozorován u lokusů Omn2, Omn15 a Omn24. Autoři také testovali těchto osmnáct mikrosatelitů na *cross-species* PCR amplifikaci u dalších dvou druhů z čeledi buňhákovití: Buňháka Bulwerova, zde byly polymorfní tři lokusy (Omn3, Omn4 a Omn7) všechny se dvěma alelami a jedenáct lokusů neamplifikovalo PCR produkt a u buňháka modravého, kde byly polymorfní dva lokusy (Omn3 a Omn28) se třemi respektive šesti alelami a PCR produkt neamplifikovalo dvanáct lokusů a dále potom u Buňháčka madeirského z čeledi buňháčkovití, u kterého byla amplifikace nejúspěšnější, jelikož sedmnáct lokusů bylo polymorfních se dvěma až šesti alelami, pouze jeden lokus (Omn23) nevykazoval polymorfismus.

4. Materiál a metody

4.1. Biologický materiál

Biologický materiál (svalstvo) byl odebrán šesti nepříbuzným jedincům potápky roháče (*Podiceps cristatus*) odchyceným na rybnících střední Moravy a pro účely mé bakalářské práce byl poskytnut pracovníky Ornitologické stanice v Přerově (ORNIS).

Školitel následně izoloval genomickou DNA za pomoci fenol-chloroformové extrakce a rozpustil ji v TE pufru. Koncentrace DNA činila 10 – 30 µg/ml.

4.2. Amplifikované mikrosatelity u potápky roháče

Testovala jsem 213 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy, které byly polymorfní u různých druhů z řádu trubkonosí, dlouhokřídlí a pěvci, na polymorfismus u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče použitím *cross-species* PCR amplifikace. Tyto primery byly popsány u sedmi druhů z čeledi albatrosovití, u devíti druhů z čeledi buňákovití, u tří druhů z čeledi buňníkovití a dále potom u tří druhů z čeledí rackovití, alkovití a kulovití a u jednoho druhu z čeledi lesňáčkovití.

Z čeledi albatrosovití bylo izolováno 53 polymorfních mikrosatelitů od sedmi druhů, které jsou popsány v pěti člancích. Tyto mikrosatelity uvádím v Tab. 1.

Tab. 1: Mikrosatelitové lokusy testované na polymorfismus u potápky roháče izolované od druhů z čeledi albatrosovití. Ve sloupcích je uveden zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu a literární zdroj.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Albatros stěhovavý (<i>Diomedea exulans</i>)	7D8, 12C8, 11H7, 10C5, 11H8, 6A3, 11H1, 11F3, 6F12, 12E1	Dubois <i>et al.</i> , 2005
	De1, De2, De3, De7, De11, De12, De17, De18, De25, De30, De33	Burg, 1999
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	

Tab. 1: Pokračování.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Albatros šedohlavý, albatros černobrvý (<i>Diomedea melanophris</i>)	De35	Burg <i>et</i> Croxall, 2001
Albatros stěhovavý, albatros jižní (<i>Diomedea antipodensis</i>)	De37	Burg <i>et</i> Croxall., 2004
Albatros černonohý (<i>Phoebastria nigripes</i>)	BFAL4, BFAL11, BFAL14, BFAL19, BFAL20	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
Albatros laysanský (<i>Phoebastria immutabilis</i>)	LAAL1, LAAL7, LAAL10, LAAL19	
Albatros bělohřbetý (<i>Phoebastria albatrus</i>)	STAL4, STAL8, STAL12, STAL18, STAL20, STAL24	

Od druhů z čeledi buňňákovití bylo publikováno deset článků, ve kterých je popsáno 100 polymorfních mikrosatelitů izolovaných od devíti druhů. Všechny tyto mikrosatelity jsem testovala u potápky roháče a jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Mikrosatelitové lokusy testované na polymorfismus u potápky roháče izolované od druhů z čeledi buňňákovití. Ve sloupcích je uveden zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu a literární zdroj.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Buňňák bělobradý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	Paequ2, Paequ3, Paequ4, Paequ7, Paequ8, Paequ10, Paequ13	Techow <i>et</i> O'Ryan, 2004
Buňňák šedý (<i>Calonectris diomedea</i>)	Cd1, Cd2, Cd3, Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd10, Cd11	Bried <i>et al.</i> , 2008
Buňňák taiko (<i>Pterodroma magentae</i>)	Tch6, Tch25	Lawrence, 2008
Buňňák trinidatský (<i>Pterodroma arminjoniana</i>)	Parm01, Parm02, Parm03, Parm04, Parm05, Parm06	Brown <i>et</i> Jordan, 2009
Buňňák baleárský (<i>Puffinus mauretanicus</i>)	Puff 1.5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2C, Puff G2F, Puff G11F, Puff PM2, Puff Sma6	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
Buňňák Bulwerův (<i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb2, Bb3, Bb7, Bb10, Bb11, Bb12, Bb20, Bb21, Bb22, Bb23, Bb25	Andris <i>et al.</i> , 2010
Buňňák havajský (<i>Pterodroma sandwichensis</i>)	Ptero01, Ptero02, Ptero03, Ptero04, Ptero05, Ptero06, Ptero07, Ptero08, Ptero09, Ptero10	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011

Tab. 2: Pokračování.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Buřňák světlenohý (<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> , 2012
Buřňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	Patbel1, Patbel2, Patbel3, Patbel4, Patbel5, Patbel6, Patbel7	Quilfeldt <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, 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

Ve třech člancích bylo popsáno 54 polymorfních mikrosatelitů izolovaných od tří druhů z čeledi buřňákovití. Testované mikrosatelitové lokusy od zástupců této čeledi jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Mikrosatelitové lokusy testované na polymorfismus u potápky roháče izolované od druhů z čeledi buřňákovití. Ve sloupcích je uveden zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu a literární zdroj.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Buřňáček dlouhokřídlý (<i>Oceanodroma leucorhoa</i>), buřňáček madeirský (<i>O. castro</i>), buřňáček Monteirův (<i>O. monteiroi</i>)	Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B, O110-39	Sun <i>et al.</i> , 2009
Buřňáček dlouhokřídlý	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

Tab. 3: Pokračování.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Buňáček Monteiřův	Omn1, Omn2, Omn3, Omn4, Omn6, Omn7, Omn8, Omn11, Omn14, Omn15, Omn16, Omn17, Omn21, Omn22, Omn23, Omn24, Omn25, Omn28	Bried <i>et al.</i> , 2012

Jelikož někteří autoři těchto článků použili u některých druhů trubkonosých šest párů primerů pro *cross-species* PCR amplifikaci od čtyř druhů ze dvou jiných ptačích řádů, konkrétně od lesňáčka žlutého z řádu pěvci a racka novozélandského, kulíka mořského a alkouna obecného z řádu dlouhokřídli, testovala jsem tyto primery pro mikrosatelitové lokusy na polymorfismus také (viz Tab. 4).

Tab. 4: Mikrosatelitové lokusy testované na polymorfismus u potápky roháče izolované od druhů z řádu dlouhokřídli a pěvci. Ve sloupcích je uveden řád, zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu a literární zdroj.

Řád	Čeleď	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Dlouhokřídli (Charadriiformes)	Alkovití (Alcidae)	Alkoun obecný (<i>Cephus guilemots</i>)	Cco5-21	Friesen <i>et al.</i> (2006)
	Rackovití (Laridae)	Racek novozélandský (<i>Larus novaehollandiae scopulinus</i>)	RBG18, RBG18M, RBG29	Lawrence (2008) podle Given <i>et al.</i> (2002)
	Kulíkovití (Charadriidae)	Kulík mořský (<i>Charadrius alexandrius</i>)	Calex-01	Brown <i>et al.</i> (2009) podle Küpper <i>et al.</i> (2007)
Pěvci (Passeriformes)	Lesňáčkovití (Parulidae)	Lesňáček žlutohý (<i>Dendroica petechia</i>)	Dpμ01	Welch <i>et al.</i> (2011) podle Dawson <i>et al.</i> (1997)

4.2.1. PCR amplifikace

PCR amplifikaci jsem testovala na DNA šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Každý PCR mix měl objem 10 μl. Tvořil ho 1 μl genomické DNA a 9 μl PCR reakční směsi uvedené v Tab. 5, celkově tedy šest 0,2ml mikrozkušavek. Nejprve jsem si připravila PCR reakční směs napipetováním jednotlivých složek do 1,5ml

mikrozkumavky podle Tab. 5, následně jsem tento mix zvortexovala a krátce zcentrifugovala a poté rozpipetovala do šesti 0,2ml mikrozkumavek, ve kterých jsem měla již napipetováno po 1 μ l genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců.

V rámci prvotního otestování jsem do reakční PCR směsi pipetovala 4 μ l roztoku $MgCl_2$ o koncentraci 25 nmol/l, jak je uvedeno v Tab. 5, tedy koncentrace ve finální PCR směsi činila 1,6 nmol/l, ale v případech, kdy po elektroforetické separaci a následné vizualizaci bylo přítomno velké množství přídavných bandů, snižovala jsem objem roztoku $MgCl_2$ na polovinu (2 μ l) a na základě toho, jaký objem roztoku $MgCl_2$ jsem do reakční směsi pipetovala, jsem zvýšila objem vody tak, aby celkový objem PCR reakční směsi zůstal stejný. V tomto případě byla koncentrace ve výsledné PCR směsi 0,8 nmol/l.

Tab. 5: Složení PCR reakční směsi (pro 6 vzorků).

Složka	Pipetovaný objem [μ l]
Deionizovaná voda	44,4
Reaction Buffer A 10x	6,7
Roztok $MgCl_2$ (25 nmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (2 nmol/l)	0,7
Primer R (10 μ mol/l)	3,3
Primer F (10 μ mol/l)	3,3
aTaq polymeráza (5U/ μ l)	1,0

Do šesti mikrozkumavek o objemu 0,2 ml jsem poté napipetovala vždy 9 μ l PCR reakční směsi a 1 μ l roztoku genomické DNA izolované z jednotlivých jedinců potápky roháče. Mikrozkumavky jsem vložila do termocykleru, kde proběhla PCR reakce, jejíž podmínky jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6: Průběh PCR reakce.

Reakční kroky	Počet cyklů	Teplota [$^{\circ}C$]	Čas
Počáteční denaturace DNA	1	94	5 min
Denaturace DNA	35	94	30 s
Annealing (nasedání primerů)		50	30 s
Elongace, syntéza DNA řetězce		72	30 s
Závěrečné prodloužení	1	72	7 min

Nejprve jsem PCR amplifikaci DNA se všemi testovanými primery provedla při teplotě *annealingu* 50 °C a pokud byl vzniklý produkt nezřetelný, snižovala jsem tuto teplotu, aby bylo dosaženo co nejlépe hodnotitelného produktu, ze kterého bylo možné stanovit, zda je lokus polymorfní. V případě polymorfních lokusů jsem teplotu *annealingu* zvyšovala z důvodu zjištění počtu alel pro genotypizaci.

4.2.2. Elektroforetická separace PCR produktů

Postup separace byl 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. Separaci jsem prováděla v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek.

Příprava polyakrylamidového gelu

Malé i velké sklo jsem důkladně omyla vodou, na malé sklo jsem navíc použila saponát. Poté jsem obě skla opláchla deionizovanou vodou, osušila jsem je, dvakrát opláchla 96% ethanolem a osušila papírovými ubrousky.

Větší sklo jsem ošetřila přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů (tekuté stěrače – Rain off) na ploše, která se poté dotýkala gelu. Přípravek jsem rozetřela papírovým ubrouskem, nechala 5 minut zaschnout a poté jsem sklo opláchla deionizovanou vodou a znovu osušila.

Menší sklo jsem ošetřila 1 ml molekulárního lepidla, které jsem rozetřela ubrouskem, nechala 5 minut zaschnout a následně jsem jej čtyřikrát opláchla 96% ethanolem a po každém opláchnutí osušila ubrouskem.

Na polystyrenovou desku v digestoři jsem položila větší sklo ošetřenou plochou nahoru, po stranách skla jsem umístila 0,4 mm silné spacers a na ně jsem položila ošetřenou plochou dolů malé sklo. Spacers jsem umístila až do kraje skel a v místě spacerů jsem na obou stranách skla sepla dvěma klipsy.

Připravila jsem si polyakrylamidový gel a postupně jej nalévala mezi skla a při tom jsem na skla druhou rukou poklepávala, aby nedošlo ke vzniku vzduchových bublin v gelu.

Následně jsem na místo, kde jsem nalévala mezi skla gel, vložila hřebínek a ten sepla dalšími čtyřmi klipsy. Poté jsem nechala gel přibližně hodinu polymerizovat.

Elektroforetická separace PCR produktů

Po utužení gelu jsem odstranila všechny klipsy, skla s gelem jsem důkladně omyla od zbytků polyakrylamidu a umístila do elektroforetické komůrky.

Do anodového a katodového prostoru jsem nalila 0,5 x TBE pufr, opatrně jsem vytáhla hřebínek a vzniklou mezeru mezi skly jsem vyčistila proudem pufru z injekční stříkačky. Katodový a anodový prostor jsem uzavřela, připojila jsem elektrody a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jsem nastavila hodnotu výkonu 90 W (hodnoty elektrického proudu i napětí byly konstantně nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA). Za těchto podmínek jsem nechala gel nahřívat po dobu 30 minut.

Během nahřívání gelu jsem si připravila vzorky, které jsem posléze nanášela, smísením roztoku PCR produktu s 5 μ l nanášecího pufru, vložila jsem je na tři minuty do termocykleru, kde jsem je denaturovala po dobu tří minut při teplotě 94 °C. Po uplynutí tří minut jsem vzorky ihned přesunula do ledové tříště, abych zabránila renaturaci vláken DNA produktů.

Jakmile byl gel nahřátý, vypnula jsem zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojila katodu a znovu jsem vyčistila prostor mezi skly od polyakrylamidu proudem pufru z injekční stříkačky. Do mezery mezi skly jsem vsunula hřebínek přibližně 1 mm hluboko do gelu. Poté jsem zdenaturované vzorky nanasla pomocí osmikanálové pipety po 2 μ l do mezer mezi zoubky hřebínku.

Po napipetování všech vzorků jsem katodový prostor uzavřela, nasadila jsem elektrodu a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jsem nastavila hodnotu výkonu 70 W. Takto jsem nechala vzorky separovat 80 – 180 minut podle molekulových hmotností dělených PCR produktů.

Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci

Po uplynutí času elektroforetického dělení jsem vypnula zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojila jsem obě elektrody, skla s gelem jsem vyjmula z elektroforetické komůrky a oddělila je od sebe nožem.

Menší sklo s přilepeným gelem jsem vložila do fotomisky gelem nahoru, fotomisku jsem položila na třepačku do digestoře a poté jsem sklo s gelem zalila fix/stop roztokem na dobu 20 minut.

Fix/stop roztok jsem slila zpět do baňky a sklo s gelem jsem třikrát promyla deionizovanou vodou, opět jsem vrátila fotomisku na třepačku a tentokrát zalila na čtyři minuty 1% roztokem kyseliny dusičné.

Roztok kyseliny dusičné jsem vylila, sklo s gelem jsem promyla čtyřikrát deionizovanou vodou a umístila jsem jej na třepačku do 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného.

Na konci této doby jsem si připravila fotomisku s deionizovanou vodou a druhou fotomisku, do které jsem sklo s gelem po pěti vteřinách oplachování ve vodě přenesla a zalila jej vývojkou. Sklo s gelem jsem nechala ve fotomisce třepat na třepačce, dokud nedošlo k vizualizaci hnědočerných proužků PCR produktů obarvených stříbrem. Vytvoření jsem zastavila zalitím fix/stop roztokem.

Po opláchnutí gelu v deionizované vodě, jsem sklo s gelem usušila v sušárně a následně byl gel vyhodnocen na negatoskopu.

4.3. Seznam použitých chemikálií

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

- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.4. Seznam použitých roztoků

Zásobní roztok 10x TBE pufr

- 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 55 g kyseliny borité
- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Zásobní 40% roztok akrylamidu : N, N'- methylenbisakrylamidu 19 : 1

- 20 g N, N'- methylenbisakrylamidu
- 380 g akrylamidu
- rozpustit v 500 ml deionizované vody
- objem doplnit na 1 l a uložit v temné lahvi v chladničce

Zásobní 6% roztok akrylamidu

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

Vývojka

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

Nanášecí pufovací roztok

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

Molekulární lepidlo

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

Fix/Stop roztok

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

6% polyakrylamidový gel

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

10% roztok peroxodisíranu amonného

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

1 mol/l roztok hydroxidu sodného

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

1% roztok kyseliny dusičné

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

0,1% roztok dusičnanu stříbrného

- 800 ml deionizované vody

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

4.5. Seznam použitých laboratorních přístrojů

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiquette – 0,5 až 10 μ l (osmikanálová) a 0,3 μ l až 1 ml (ThermoLabsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 μ l až 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

Mým úkolem bylo otestovat u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče mikrosatelitové lokusy, které byly polymorfní u zástupců řádu trubkonosí, nalézt mikrosatelity, které jsou u potápky roháče polymorfní a u těchto lokusů na základě experimentů stanovit optimální teplotu *annealingu* (T_a) a optimální koncentraci hořečnatých iontů v PCR mixu, popřípadě délku elektroforetické separace. Se všemi mikrosatelitovými lokusy jsem provedla PCR amplifikaci při teplotě 50 °C a následnou elektroforetickou separaci. Pokud nedošlo ke vzniku produktu, PCR amplifikaci jsem opakovala se sníženou teplotou *annealingu*, kdy nejnižší teplota činila 44 °C. Naopak v případě, kdy došlo ke vzniku produktu, ale bandy byly příliš silné, nehodnotitelné nebo se překrývaly, teplotu jsem zvyšovala až na 68 °C. Pokud zvýšení teploty nevedlo k hodnotitelnému výsledku, zkombinovala jsem změnu teploty se změnou koncentrace hořečnatých iontů v PCR mixu, kterou jsem snížila u některých mikrosatelitů na polovinu. Toto snížení bylo provedeno tak, že jsem snížila objem roztoku $MgCl_2$ o koncentraci 25 nmol/l na poloviční hodnotu a naopak jsem o tento objem zvýšila objem vody, aby se celkový objem PCR mixu nezměnil. V tomto případě byla koncentrace ve výsledném roztoku 0,8 nmol/l oproti standardní koncentraci 1,6 nmol/l.

Otestovala jsem celkem 213 mikrosatelitů na DNA šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*), přičemž 207 z těchto mikrosatelitů bylo izolováno od zástupců z řádu trubkonosí, kdy 53 mikrosatelitů pocházelo od sedmi druhů z čeledi albatrosovití (Diomedidae), 54 mikrosatelitů od zástupců tří druhů z čeledi buňňáčkovití (Hydrobatidae) a zbylých 100 mikrosatelitů izolovaných od devíti druhů z řádu buňňákovití (Procellariidae). Zbylých šest mikrosatelitů pocházelo od zástupců řádů dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pěvci (Passeriformes), konkrétně se jednalo o tři mikrosatelity od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*), jeden mikrosatelit od alkouna obecného (*Cephus guilemots*) a jeden mikrosatelit od kulíka mořského (*Charadrius alexandrius*), přičemž tyto tři druhy se řadí do řádu dlouhokřídlí a dále jeden mikrosatelit od lesňáčka žlutonohého (*Dendroica petechia*) z řádu pěvci. Tyto mikrosatelity byly dříve testovány u některého druhu z řádu trubkonosí a poskytovaly u něj polymorfní produkt, proto jsem je do svých testů zahrnula také.

Všechny testované mikrosatelitové lokusy poskytly monomorfní nebo polymorfní produkt, tedy žádný z nich nebyl bez produktu. Celkem jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace našla 20 polymorfních mikrosatelitových lokusů u potápky roháče se dvěma až osmi alelami. Tyto polymorfní mikrosatelitové lokusy jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7: Charakteristika dvaceti nalezených mikrosatelitových lokusů testovaných na šesti nepříbuzných jedincích potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny název mikrosatelitového lokusu, kód v databázi GeneBank (Accession number – Acc. no.), zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel, teplota *annealingu* (T_a) a délka elektroforetické separace.

Název lokusu (Acc. no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů 5' → 3'	Jednotka repetice	Počet alel	(T_a) [°C]	Délka elektroforetické separace [min]
Pc A107 (JX435472)	Buňňák světlenohý	(F) AAAGCCAGTAGGTGTATTCAAC (R) AAGTGGGAGGAAAGAGTGTAG	GT	2	51	90
Pc B109 * (JX435475)		(F) CTCAGAGCGATCACACTGTACT (R) AAAGCATTGAGGATGTAGGTTT	CAA	5	53	90
Pc D3 (JX435478)		(F) CCTCTGCTCAAGTCTGTCAC (R) AAACCTCCTTTGGGATGA	GATA/GAAA	3	55	90
Pc D103 (JX435479)		(F) GGAAAGATGTCATGCTGATGA (R) GTGGGAGATTCATAGGCAAAG	GATA/GATG	2	64	90
Pc B115 (JX435476)		(F) AAATAAGAGGCGTGTCTAAGA (R) ATTCGTGGATTGAGATAAAGAC	GTT/ATT	2	57	90
Patbel2 (JF288776)	Buňňák útlozobý	(F) GGTGTCATGCAACTGACTGAA (R) CAATGGGAATGGCAGAGACT	CTAT	5	65	90
Pacbel_17986 (neuveďeno)		(F) ATAACCCAGTGTGATGGTGC (R) CACAGCTGCTTAGTGCACAG	GT	2	68	90
Bb11 (HM171894)	Buňňák Bulwerův	(F) CTGGCATCAGTCCCTTACCT (R) GCTCTTACGAATCCGCTACC	GA	3	67	90
Bb21 (HM171897)		(F) CTGATGTTCCAGGCCCTAAT (R) CCTCTGAGCCAGCTAATTCC	TG	5	63	90
Parm03 (neuveďeno)	Buňňák trinidadský	(F) CTTGCTGGGTTTTGTGGTT (R) AATTGCTCAGGGAGGTGCT	CA/TA	3	54	90

Tab. 7: Pokračování.

Název lokusu (Acc. no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů 5' → 3'	Jednotka repetice	Počet alel	(T _a) [°C]	Délka elektroforetické separace [min]
Cd7 (EU029089)	Buňák šedý	(F) AATAACCGCCTGACCAAATG (R) TGAACCTCACCTGTGTCTGC	CT/AT/AC	2	52	180
Cd9 (EU029091)		(F) TGGCAAAGGATCACGTTAGA (R) CCAAAGGTTGCACATGAGTG	TG	6	52	180
Tch6 (neuvedeno)	Buňák taiko	(F) CAATGGGAATGGCAGAGACT (R) CAATGGGAATGGCAGAGACT	GT/GC	2	58	90
Dc27 (AF096807)	Albatros šedohlavý	(F) CACCCATTTTTGCAGTTCAC (R) TCCCCTTGCTTGTGATTATG	AC	2	51	90
Dc5 (AF096790)		(F) AGGAGGGAAACTTCTCCCAG (R) AGCAGGGAGTGACTTGAGGAG	AC/CAC	4	58	90
De7 (AF096792)	Albatros stěhovavý	(F) GAGGAAAACCTCCATCTGCCA (R) TCTGAACCTCTATCAAAAGG	AC	2	58	90
STAL8 (neuvedeno)	Albatros bělohřbetý	(F) CCCTGCTGGGTTTCATTTTC (R) CATTGTGTCAGTAGGCATGG	TG	2	59	90
Oc49 (FJ238098)	Buňáček madeirský	(F) TGCTTCTGGATTTGTTTTGC (R) CAAACCGTGTGACCCAGATA	CA	3	53	90
Omn8 * (JQ303232)	Buňáček Monteirův	(F) TGCAACCTTAGCATTACCTAGC (R) GGGGCGAGCATTACATTA	AC	6	47	90
OI10-39 (FJ238106)	Buňáček dlouhokřídý	(F) TTAAGAACAGAGCCTGACTTG (R) ACAAATCTCATGTCCTTGG	GT	8	60	90

Legenda: * – poloviční koncentrace hořčičných iontů v PCR mixu (0,8 nmol/l) oproti koncentraci ve standardním PCR mixu (1,6 nmol/l)

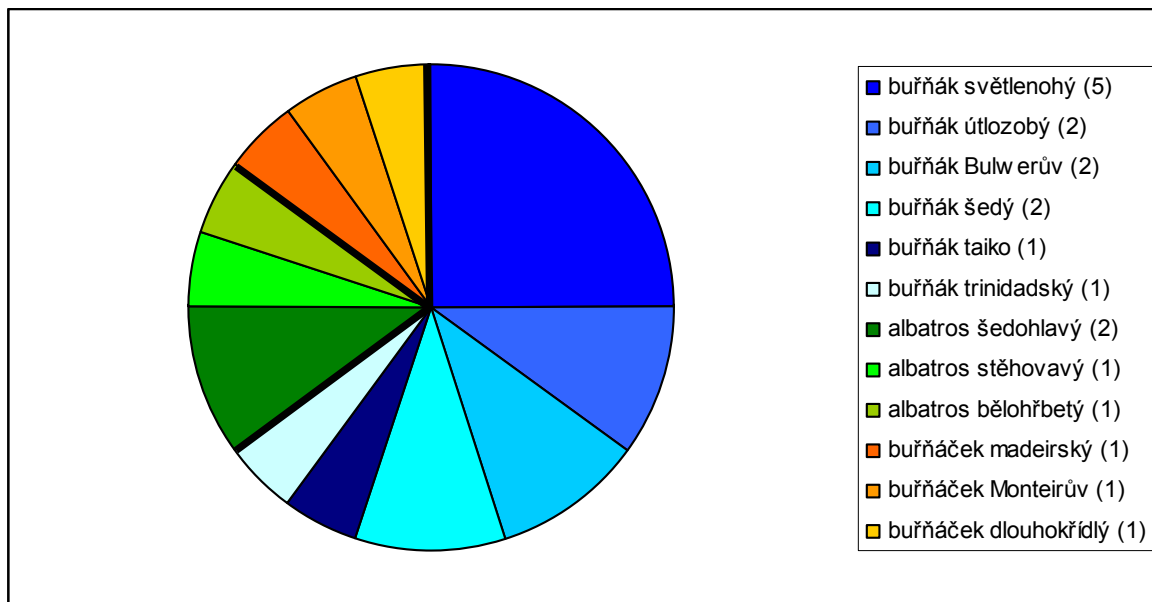
Jak pro všechny testované mikrosatelity, tak pro mikrosatelity odvozené od jednotlivých čeledí jsem vypočítala úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitu. Z celkového počtu 213 testovaných mikrosatelitových lokusů činí dvacet z nich polymorfních u potápky roháče úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace 9,4 %. V rámci čeledí největší úspěšnost získání polymorfních mikrosatelitových lokusů použitím této metody měly mikrosatelity od zástupců čeledi buňňákovití, kdy ze 100 mikrosatelitů jich bylo 13 polymorfních, tedy 13,0% úspěšnost. V rámci této čeledi vykazovaly největší úspěšnost mikrosatelitové lokusy izolované od buňňáka světlého, kdy z jedenácti testovaných lokusů od tohoto druhu, jich bylo u potápky roháče polymorfních pět, tedy 45,5% úspěšnost. Z 53 testovaných lokusů od zástupců čeledi albatrosovití byly polymorfní čtyři lokusy, což odpovídá 7,5% úspěšnosti. Nejmenší úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů měly ty z čeledi buňňáčkovití, kde z 54 testovaných lokusů vykazovaly polymorfismus tři z nich, tedy 5,5% úspěšnost. Vztaheno na počty mikrosatelitů, v této práci platí, čím větší byla úspěšnost k získání polymorfních mikrosatelitů, tím větší byl absolutní počet mikrosatelitů.

Z pohledu zastoupení čeledí mezi všemi nalezenými polymorfními mikrosatelity u potápky roháče je 65% zastoupení (13) mikrosatelitů od čeledi buňňákovití, 20% zastoupení (4) mikrosatelitů od čeledi albatrosovití a 15% (3) od čeledi buňňáčkovití.

Z šesti testovaných mikrosatelitů odvozených od zástupců z řádu dlouhokřídlí a pěvců nebyl polymorfní u potápky roháče ani jeden z nich.

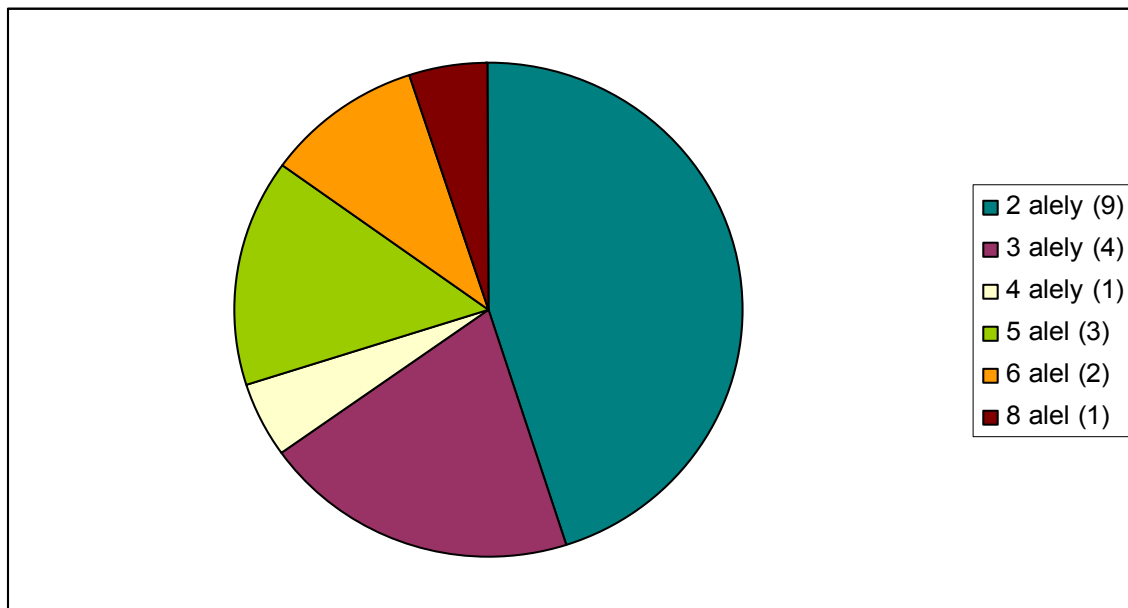
Z dvaceti nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů u potápky roháče jich tedy 13 bylo původně navržených pro zástupce čeledi buňňákovití, konkrétně pět lokusů pro buňňáka světlého (*Puffinus carneipes*), dva lokusy pro buňňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*), dva lokusy pro buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), dva lokusy pro buňňáka šedého (*Calonectris diomedea*) a po jednom lokusu pro buňňáka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*) a buňňáka taiko (*P. magentae*). Další čtyři mikrosatelitové lokusy byly původně izolovány od jedinců z čeledi albatrosovití, dva lokusy od albatrosa šedohlavého (*Diomedea chrysostoma*) a po jednom lokusu od albatrosa stěhovavého (*D. exulans*) a albatrosa bělohřbetého (*Phoebastria albatrus*). Poslední tři lokusy pocházely od buňňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*), buňňáčka Monteirova (*O. monteiroi*) a buňňáčka bělavého (*O. leucorhoa*). Mikrosatelity polymorfní u potápky roháče rozdělené vzhledem k čeledi respektive druhu, od kterého byly odvozeny, jsou přehledně znázorněny na Grafu č. 1.

Graf č. 1: Rozdělení 20 polymorfních mikrosatelitových lokusů podle čeledí a druhů pro které byly původně navrženy. Čísla v závorkách udávají počet polymorfních lokusů u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče odvozených od jednotlivých druhů, druhy z čeledi buňňákovití jsou značeny modře, z čeledi albatrosovití zeleně a z čeledi buňňáčkovití oranžově, přičemž tučné čáry jednotlivé čeledi oddělují.



Téměř polovina polymorfních mikrosatelitů (9 z 20) u potápky roháče vykazovala dvě alely, dalších jedenáct mikrosatelitů mělo od tří do osmi alel. Čím větší byl počet alel, tím bylo mikrosatelitů s tímto počtem méně, s výjimkou mikrosatelitu se čtyřmi alelami, který jsem našla pouze jeden, a tedy s tímto trendem nekoreluje. U dvoualelových mikrosatelitů je určitá malá pravděpodobnost, že se jedná o nějaké jiné oblasti DNA omylem označené za mikrosatelity, což by však dokázala odhalit teprve analýza na větším počtu jedinců. Obecně také platí, čím více má mikrosatelit alel, tím je lepším markerem. Rozdělení polymorfních lokusů na základě počtu alel u potápky roháče je znázorněno na Grafu č. 2.

Graf č. 2: Rozdělení 20 polymorfních mikrosatelitových lokusů z hlediska počtu alel u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče pocházejících od zástupců řádu trubkonosí. Čísla v závorkách udávají počet polymorfních lokusů s konkrétními počty alel.



Jelikož byla *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů testována na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče, u polymorfních mikrosatelitů byly vyhodnoceny genotypy, které jsou uvedeny v Tab. 8

Tab. 8: Charakteristika genotypů dvaceti polymorfních mikrosatelitových lokusů u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny název mikrosatelitového lokusu, zdrojový druh, počet alel a genotyp šesti nepříbuzných jedinců.

Název lokusu	Zdrojový druh	Počet alel	Genotypy
Pc A107	Buňák světlenohý	2	$1/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$
Pc B109		5	$5/5$ $4/4$ $2/2$ $5/5$ $1/1$ $3/5$
Pc D3		3	$3/3$ $2/3$ $3/3$ $1/2$ $2/3$ $2/2$
Pc D103		2	$1/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$
Pc B115		2	$1/2$ $1/1$ $1/2$ $1/2$ $1/1$ $1/2$
Patbel2		Buňák útlozobý	5
Pachel_17986	2		$2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
Bb11	Buňák Bulwerův	3	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $2/3$ $2/2$ $2/2$
Bb21		5	$1/2$ $5/5$ $3/4$ $3/4$ $3/5$ $3/3$
Parm03	Buňák trinidatský	3	$1/1$ $2/3$ $1/2$ $1/2$ $1/3$ $1/3$
Cd7	Buňák šedý	2	$1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/2$
Cd9		6	$5/5$ $3/3$ $1/1$ $4/4$ $6/6$ $2/2$
Tch6	Buňák taiko	2	$2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
Dc27	Albatros šedohlavý	2	$1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/1$

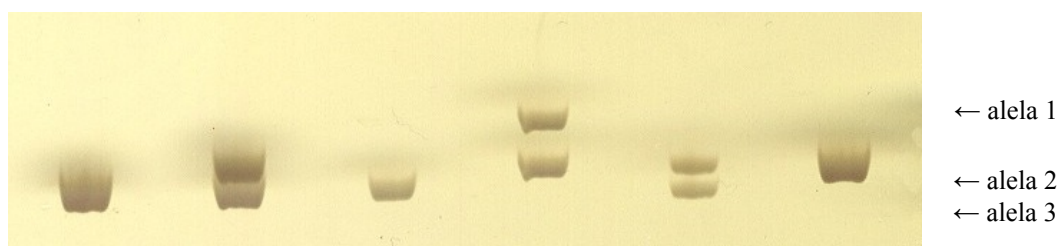
Tab. 8: Pokračování.

Název lokusu	Zdrojový druh	Počet alel	Genotypy
Dc5	Albatros šedohlavý	4	$1/1$ $2/3$ $1/2$ $2/4$ $2/4$ $1/2$
De7	Albatros stěhovavý	2	$1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$
STAL8	Albatros bělohřbetý	2	$1/2$ $2/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/1$
Oc49	Buřňáček madeirský	3	$2/2$ $3/3$ $2/2$ $2/2$ $1/1$ $3/3$
Omn8	Buřňáček Monteirův	6	$2/4$ $2/6$ $2/5$ $1/3$ $5/6$ $4/5$
OI10-39	Buřňáček dlouhokřídý	8	$1/4$ $8/8$ $6/6$ $3/7$ $2/7$ $5/5$

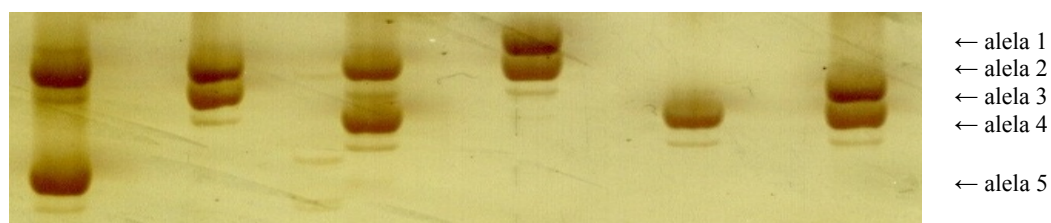
Zajímavý výsledek v rámci genotypizace jsem zjistila u mikrosatelitového lokusu Cd9, který u potápky roháče měl šest alel. Ačkoli jsem mikrosatelitové lokusy testovala u šesti nepříbuzných jedinců, pro tento lokus bylo všech šest jedinců homozygotních, a to každý pro jinou z šesti alel.

Na následujících obrázcích jsou zobrazeny výsledky *cross-species* PCR amplifikace a následné elektroforetické separace mikrosatelitových lokusů Pc D3 (viz Obr. 2) a Patbel 2 (viz Obr. 3), u nichž jsem u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče našla tři a pět alel.

Obr. 2: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Pc D3 u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Čísla označují jedince a šipky jednotlivé alely příslušného mikrosatelitového lokusu.



Obr. 3: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Patbel 2 u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Čísla označují jedince a šipky jednotlivé alely příslušného mikrosatelitového lokusu.



6. Diskuze

V této bakalářské práci jsem testovala 213 mikrosatelitových lokusů s primery původně navrženými pro zástupce řádů trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci na *cross-species* PCR amplifikaci u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Pomocí této metody jsem našla 20 polymorfních mikrosatelitových lokusů se dvěma až osmi alelami. Polymorfismus vykazovaly pouze mikrosatelitové lokusy od druhů z řádu trubkonosí. U šesti testovaných lokusů od druhů z řádu dlouhokřídli a pěvci, které byly již dříve polymorfni u zástupců řádu trubkonosí, jsem polymorfismus nenalezla.

U čeledi buňňákovití je známo 100 mikrosatelitových lokusů od devíti druhů, přičemž u potápky roháče jsem našla polymorfních 13 z nich od šesti druhů, konkrétně pět mikrosatelitových lokusů od buňňáka světlenohého (*Puffinus carneipes*) se dvěma až pěti alelami, dva mikrosatelitové lokusy od buňňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*) se dvěma a pěti alelami, dva mikrosatelitové lokusy od buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) se třemi a pěti alelami, dva mikrosatelitové lokusy od buňňáka šedého (*Calonectris diomedea*) se dvěma a šesti alelami a po jednom mikrosatelitovém lokusu od buňňáka taiko (*Pterodroma magentae*) a trinidadského (*P. arminjoniana*) se dvěma a třemi alelami. Polymorfismus jsem u potápky roháče našla u mikrosatelitových lokusů izolovaných od buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), havajského (*Pterodroma sandwichensis*) a baleárského (*Puffinus mauretanicus*).

Hardesty *et al.* (2012) našli u buňňáka světlenohého jedenáct polymorfních mikrosatelitových lokusů, přičemž polymorfismus byl testován na 84 jedincích tohoto druhu. U mikrosatelitu Pc A107 při teplotě *annealingu* 55 °C našli autoři pět alel. Já jsem u tohoto mikrosatelitu při T_a 51 °C a délce elektroforetické separace 90 minut našla dvě alely. Co se týče mikrosatelitu Pc B109, při T_a 57 °C detekovali pět alel, stejný počet alel jsem našla i já, a to při T_a 53 °C, polovičním objemu roztoku $MgCl_2$ (2 μ l o koncentraci 25 nmol/l), tedy koncentraci 0,8 nmol/l ve finálním PCR mixu a délce elektroforetické separace 90 minut. U mikrosatelitu Pc D3 bylo popsáno při T_a 56 °C šest alel, já jsem u tohoto mikrosatelitu při T_a 55 °C a délce elektroforetické separace našla tři alely. Dalším mikrosatelitem vykazujícím polymorfismus u potápky roháče byl Pc D103, u kterého při T_a 59 °C našli šest alel, zatímco já jsem při T_a 64 °C zjistila pouze dvě alely. Posledním polymorfním mikrosatelitem izolovaným od buňňáka světlenohého byl Pc B115, u kterého při T_a 55 °C byly u tohoto druhu nalezeny tři alely, a já jsem u potápky roháče při T_a 57 °C detekovala alely dvě.

Quilfeldt *et al.* (2012) našli a charakterizovali sedm polymorfních mikrosatelitových lokusů u deseti jedinců buňáka útlozobého. U mikrosatelitu Patbel2 detekovali 16 alel, přičemž T_a autoři neuvádějí. Já jsem u tohoto mikrosatelitu našla při T_a 65 °C pět alel.

Moodley *et al.* (2015) izolovali 25 polymorfních mikrosatelitových lokusů u 465 jedinců buňáka útlozobého. U mikrosatelitu Pacbel_17986 našli pět alel při T_a 56 °C, já jsem při T_a 68 °C našla dvě alely. Autoři těchto 25 mikrosatelitů testovali také na *cross-species* PCR amplifikaci u dalších pěti druhů z čeledi buňákovití, přičemž u všech druhů byl mikrosatelit Pacbel_17986 polymorfní, a to u 77 jedinců buňáka holubího se šesti alelami, u 117 jedinců buňáka širokozobého se čtyřmi alelami, u 33 jedinců buňáka hrdliččího se třemi alelami, u 16 jedinců buňáka Salvinova s pěti alelami a u 97 jedinců buňáka modravého se čtyřmi alelami. Dále potom u 6 jedinců buňáčka oceánského z čeledi buňáčkovití, u kterého polymorfismus tento mikrosatelitů nevykazoval.

Andris *et al.* (2010) našli jedenáct polymorfních mikrosatelitových lokusů u 91 jedinců buňáka Bulwerova. U potápky roháče vykazovaly polymorfismus dva z těchto mikrosatelitů. U mikrosatelitu Bb11 jsem zjistila stejný počet alel jako autoři článku a to tři, přičemž u buňáka Bulwerova byla T_a 58 °C a u potápky roháče 67 °C. Co se týče mikrosatelitu Bb21, u něj při T_a 58 °C našli také tři alely a já jsem při T_a 63 °C detekovala u potápky roháče alel pět. Dále jsou v článku popsány výsledky testování těchto 11 mikrosatelitů na *cross-species* PCR amplifikaci u dalších dvou druhů z čeledi buňákovití, konkrétně buňáka modravého a bělobradého a buňáčka Monteirova z čeledi buňáčkovití, přičemž mikrosatelit Bb 11 byl polymorfní u všech tří druhů. Počty testovaných jedinců ani počty alel nejsou autory uvedeny.

Brown *et al.* (2009) objevili u 340 jedinců buňáka trinidadského dvanáct mikrosatelitových lokusů. U potápky roháče na *cross-species* PCR amplifikaci vykazoval polymorfismus pouze jeden z těchto mikrosatelitů. U mikrosatelitu Parm03 bylo popsáno při T_a 55 °C devět alel. Já jsem u tohoto mikrosatelitu při T_a 54 °C našla tři alely. Autoři těchto 12 mikrosatelitů testovali také na *cross-species* PCR amplifikaci u dalších celkem 133 jedinců ze 17 druhů z řádu trubkonosí: U 14 druhů z čeledi buňákovití, u tří druhů z čeledi albatrosovití a jednoho druhu tučňáka, konkrétně u tučňáka žlutohého. Mikrosatelit Parm03 neamplifikoval PCR produkt u pěti druhů z čeledi buňákovití, u dalších šesti druhů z čeledi buňákovití a jednoho druhu z čeledi albatrosovití byl monomorfní a polymorfismus vykazoval u zbylých čtyř druhů z čeledi

buřňákovití, dvou druhů z čeledi albatrosovití a tučňáka žlutonohého a měl od dvou do šesti alel.

U 43 jedinců buřňáka šedého našli Bried *et al.* (2008) jedenáct polymorfních mikrosatelitů, kdy dva z těchto mikrosatelitů vykazovaly polymorfismus i u potápky roháče. U mikrosatelitu Cd7 detekovali autoři při T_a 58 °C dvě alely, já jsem našla stejný počet alel při T_a 52 °C. Co se týče mikrosatelitu Cd9, zde při T_a 58 °C byly u buřňáka šedého zjištěny čtyři alely a já jsem u potápky roháče při T_a 52 °C našla alel šest. Těchto jedenáct mikrosatelitů bylo autory testováno také na *cross-species* PCR amplifikaci u buřňáka Bulwerova a bělobradého z čeledi buřňákovití a albatrosa stěhovavého z čeledi albatrosovití. Mikrosatelit Cd7 vykazoval polymorfismus pouze u buřňáka Bulwerova, u dalších dvou druhů neamplifikoval PCR produkt a mikrosatelit Cd9 byl polymorfní u buřňáka bělobradého a Bulwerova a u albatrosa stěhovavého neamplifikoval PCR produkt. Počty testovaných jedinců ani počty alel nejsou uvedeny.

Lawrence (2008) testovala polymorfismus u téměř 150 jedinců buřňáka taiko, přičemž našla dva nové mikrosatelitové lokusy. U potápky roháče vykazoval polymorfismus jeden z těchto mikrosatelitů Tch6, který měl stejný počet alel jako u buřňáka taiko, a to dvě. Lawrence stanovila optimální T_a na 50 °C, já jsem použila T_a 58 °C.

V rámci čeledi albatrosovití bylo doposud izolováno 53 mikrosatelitových lokusů od sedmi druhů. Já jsem našla polymorfismus u 4 lokusů od tří druhů. Dva mikrosatelitové lokusy od albatrosa šedohlavého (*Diomedea chrysostoma*) se dvěma a čtyřmi alelami a po jednom lokusu se dvěma alelami od albatrosa stěhovavého (*D. exulans*) a bělohřbetého (*Phoebastria albatrus*). Naopak u potápky roháče polymorfismus nevykazovaly mikrosatelitové lokusy od albatrosa černobrvého (*D. melanophris*), jižního (*D. antipodensis*), černonohého (*P. nigripes*) a laysanského (*P. immutabilis*).

Burg (1999) našla u 50 jedinců albatrosa šedohlavého a 90 jedinců albatrosa stěhovavého celkem 26 mikrosatelitových lokusů. Po otestování těchto mikrosatelitů na *cross-species* PCR amplifikaci u potápky roháče vykazovaly polymorfismus tři z těchto mikrosatelitů, konkrétně dva mikrosatelity izolované od albatrosa šedohlavého a jeden mikrosatelit od albatrosa stěhovavého. Autorka použila při testování variantu PCR, kdy prvních sedm cyklů reakce probíhalo za T_{a1} a dalších 25 cyklů za T_{a2} . U mikrosatelitu Dc27 Burg (1999) našla při T_{a1} 46 °C a T_{a2} 48 °C čtyři alely, já jsem u potápky roháče při T_a 51 °C zjistila alely dvě. U mikrosatelitu Dc5 autorka detekovala při T_{a1} 46 °C a

T_{a2} 48 °C pět alel, zatímco já jsem při T_a 58 °C našla čtyři alely. U mikrosatelitu De7 izolovaného od albatrosa stěhovavého jsem našla u potápky roháče dvě alely stejně tak jako u zdrojového druhu, kdy byla použita T_{a1} 48 °C a T_{a2} 52 °C a já T_a 58 °C. Autorka otestovala těchto 26 mikrosatelitů i na *cross-species* PCR amplifikaci 50 jedinců albatrosa černobrvého, kdy mikrosatelity De7, Dc5 a Dc27 byly u tohoto druhu polymorfní se dvěma, pěti a čtyřmi alelami.

U tří jedinců albatrosa bělohřbetého našli Hernandez *et al.* (2014) šest mikrosatelitových lokusů. Mikrosatelit STAL8 byl při T_a 60 °C u tohoto druhu polymorfní se dvěma alelami, přičemž stejný počet alel jsem našla i u potápky roháče, avšak při T_a 59 °C.

Co se týče čeledi buňňáčkovití, zde je známo 54 mikrosatelitových lokusů od tří druhů, kdy u potápky roháče vykazovaly polymorfismus tři mikrosatelity, od každého druhu jeden. Konkrétně po jednom mikrosatelitovém lokusu od buňňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*) se třemi alelami, buňňáčka Monteirova (*O. monteiroi*) s šesti alelami a buňňáčka dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*) s osmi alelami.

Sun *et al.* (2009) izolovali od 24 jedinců buňňáčka dlouhokřídlého, 22 jedinců buňňáčka Monteirova a 27 jedinců buňňáčka madeirského deset mikrosatelitových lokusů. Dva z těchto mikrosatelitů vykazovaly polymorfismus i u potápky roháče. U mikrosatelitu Oc49 našli autoři při T_a 50 °C u buňňáčka dlouhokřídlého a Monteirova tři alely a u buňňáčka madeirského byl tento mikrosatelit monomorfní. Já jsem při T_a 53 °C detekovala stejný počet alel. Druhým polymorfním mikrosatelitem u potápky roháče byl O110-39, u kterého jsem našla při T_a 60 °C největší počet alel, a to osm. Článek popisuje u tohoto mikrosatelitu při T_a 50 °C u buňňáčka Monteirova a madeirského také po osmi alelách a u buňňáčka dlouhokřídlého alely tři.

Bried *et al.* (2012) našli a charakterizovali u 125 jedinců buňňáčka Monteirova 18 mikrosatelitových lokusů. U mikrosatelitu Omn8 našli při T_a 58 °C deset alel, já jsem při T_a 47° C a polovičním objemu roztoku $MgCl_2$ (2 μ l) o koncentraci 25 nmol/l v PCR mixu našla u potápky roháče alel šest. Těchto 18 mikrosatelitů autoři testovali také na *cross-species* PCR amplifikaci u dalších dvou druhů po pěti jedincích od každého z čeledi buňňáčkovití: Buňňáka Bulwerova a modravého a u pěti jedinců buňňáčka madeirského z čeledi buňňáčkovití. Mikrosatelit Omn8 byl polymorfní pouze u buňňáčka madeirského a měl šest alel. U zbylých dvou druhů neamplifikoval PCR produkt.

Nedvědová (2015) ve své diplomové práci testovala stejné mikrosatelity od zástupců řádu trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci na *cross-species* PCR amplifikaci u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) z řádu brodiví, přičemž našla celkem 46 polymorfních mikrosatelitů se dvěma až pěti alelami. Ve srovnání s *cross-species* PCR amplifikací u potápky roháče, vykazovalo polymorfismus zároveň u nesyta indomalajského i potápky roháče pět mikrosatelitů (Pc D3, Pc D103, Patbel2, Tch6 a Omn8) (viz Tab. 9).

Tab. 9: Mikrosatelity odvozené od zástupců řádu trubkonosí, které byly polymorfní zároveň u potápky roháče i nesyta indomalajského. Ve sloupcích jsou uvedeny název mikrosatelitové lokusu, zdrojový druh, počet alel u potápky roháče (tato práce) a počet alel u nesyta indomalajského (Nedvědová, 2015).

Mikrosatelitový lokus	Zdrojový druh	Potápka roháč (počet alel)	Nesyt indomalajský (počet alel)
Pc D3	Buřňák světlenohý (<i>Puffinus carneipes</i>)	3	2
Pc D103		2	2
Patbel2	Buřňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	5	5
Tch6	Buřňák taiko (<i>Pterodroma magentae</i>)	2	3
Omn8	Buřňáček Monteirův (<i>Oceanodroma monteiroi</i>)	6	4

Mikrosatelitové lokusy Pc D3 a Pc D103 byly dále polymorfní u 84 jedinců buřňáka světlenohého, kde bylo u každého z nich detekováno 6 alel (Hardesty *et al.*, 2012), mikrosatelit Patbel2 byl polymorfní s 16 alelami u deseti jedinců buřňáka útlozobého (Quilfeldt *et al.*, 2012), Tch6 u 150 jedinců buřňáka taiko, u kterého byly nalezeny dvě alely (Lawrence, 2008) a Omn8 byl polymorfní s deseti alelami u 125 jedinců buřňáčka Monteirova (Bried *et al.*, 2012). Jelikož těchto pět mikrosatelitů bylo polymorfních u zástupců řádů trubkonosí, potápky a brodiví, mají velký potenciál i u jiných vodních ptáků, zejména mikrosatelity Patbel2 a Omn8, které vykazovaly u všech těchto tří řádů vysoké počty alel.

Hoffmannová (2013) v rámci své diplomové práce testovala celkem 407 všech tehdy existujících mikrosatelitových lokusů izolovaných od zástupců řádů potápky, potáplice, brodiví, veslonozí, plameňáci a dále 17 mikrosatelitů od zástupců řádů

tučňáci, vrubozobí a dlouhokřídli u 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče, přičemž u tohoto druhu nalezla celkem 42 polymorfních mikrosatelitů (viz Tab. 10).

Z testovaných mikrosatelitů jich 18 pocházelo od zástupců řádu potápky, přičemž 14 z nich bylo u potápky roháče polymorfních. Dalších 45 mikrosatelitů bylo původně navrženo pro zástupce řádu plameňáci, z nichž sedm vykazovalo polymorfismus. Od zástupců čeledi veslonozí pocházelo 152 mikrosatelitových lokusů a celkem 10 z nich bylo polymorfních. V rámci čeledi brodiví bylo testováno 168 mikrosatelitů z nichž 9 vykazovalo polymorfismus. Co se týče lokusů od druhů z řádu dlouhokřídli, zde byl polymorfni jeden ze dvou testovaných a od řádu vrubozobí byl také jeden lokus polymorfni ze 13 testovaných. V rámci řádu tučňáci byly testovány dva mikrosatelitové lokusy, přičemž ani jeden z nich nebyl u potápky roháče polymorfni, taktéž ze sedmi mikrosatelitů pocházejících od potáplice lední z řádu potáplicovití nevykazoval ani jeden z nich u potápky roháče polymorfismus.

Filipová (nepublikováno) testovala v rámci své bakalářské práce celkem 171 mikrosatelitových lokusů, z nichž 113 bylo izolováno od zástupců řádu tučňáci a zbylých 59 párů primerů bylo univerzálních, konkrétně se jednalo o 24 konzervativních ptačích mikrosatelitů (CAM) a 35 EST sekvencí, na *cross-species* PCR amplifikaci u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Celkem vykazovalo polymorfismus 19 lokusů, přičemž šest z nich pocházelo od druhů z řádu tučňáci, dalších pět byly konzervativní ptačí mikrosatelity (Dawson *et al.*, 2013) a 8 EST sekvencí (Dawson *et al.*, 2010) (viz Tab. 10).

Tab. 10: Výsledky *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů od zástupců řádů potápky, potáplice, brodiví, veslonozí, plameňáci, tučňáci, vrubozobí a dlouhokřídli u 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče a mikrosatelitů od zástupců řádů tučňáci, trubkonosí, dlouhokřídli, pěvci, EST a CAM u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny název řádu z něhož byly mikrosatelitové lokusy izolovány, počet testovaných mikrosatelitů, počet polymorfních mikrosatelitů a procentuální úspěšnost amplifikace polymorfního mikrosatelitu (tato práce; Hoffmannová, 2013; Filipová, nepublikováno).

Zdrojový řád mikrosatelitu (skupina testovaných mikrosatelitů)	Počet testovaných mikrosatelitů	Počet polymorfních mikrosatelitů	Úspěšnost zachycení polymorfního mikrosatelitu v rámci testované skupiny [%]
potápky	18	14	77,8
EST	35 ^Δ	8 ^Δ	22,9 ^Δ
CAM	24 ^Δ	5 ^Δ	20,8 ^Δ
plameňáci	45	7	15,6
trubkonosí	207*	20*	9,7*
veslonozí	152	10	6,6
brodiví	168	9	5,4
tučňáci	2/113 ^Δ	0/6 ^Δ	0/5,3 ^Δ
potáplice	7	0	0
pěvci	1*	0*	0*
dlouhokřídli	2/5*	1/0*	-
vrubozobí	13	1	-
celkem	792	81	10,2

Legenda: * – údaje získané na základě mého testování (6 nepříbuzných jedinců potápky roháče)

^Δ – údaje analýzy Filipová (nepublikováno); (6 nepříbuzných jedinců potápky roháče)

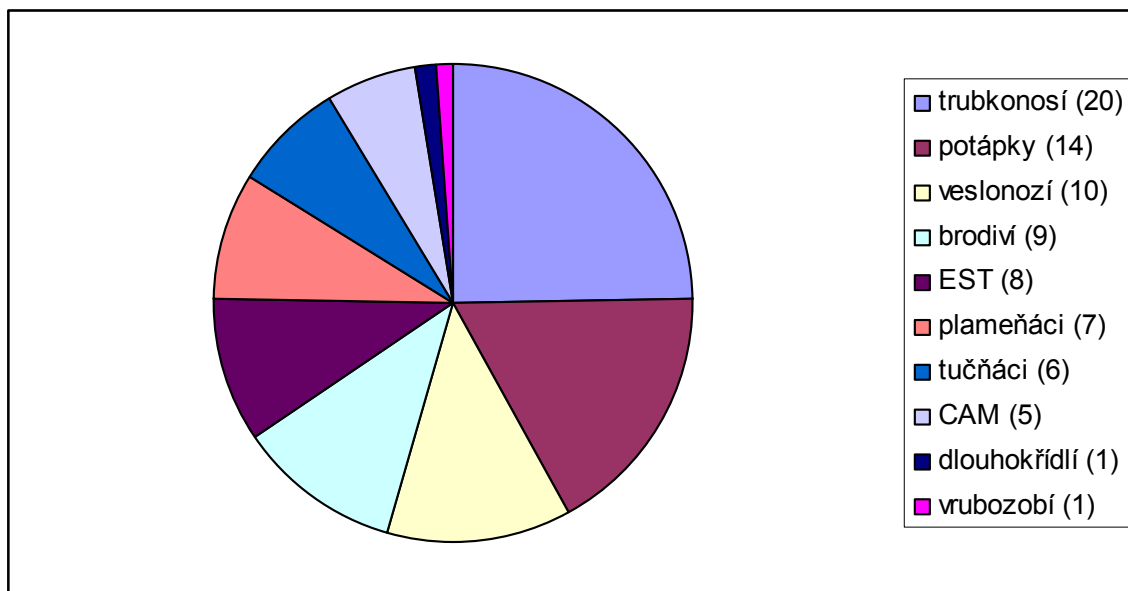
údaje bez symbolu – Hoffmannová (2013); (13 nepříbuzných jedinců potápky roháče)

Co do úspěšnosti zachycení polymorfního mikrosatelitu v rámci testované skupiny (viz Tab. 10), měly největší úspěšnost mikrosatelity izolované od zástupců stejného řádu, tedy potápek. Dalšími úspěšnými mikrosatelity u potápky roháče byly CAM, EST a mikrosatelity od zástupců řádu plameňáci, což souvisí s příbuzností s řádem potápky (Jarvis *et al.*, 2014). Z celkového počtu 792 testovaných mikrosatelitů

činí 81 z nich polymorfních úspěšnost zachycení polymorfního mikrosatelitu v rámci testované skupiny 10,2 %.

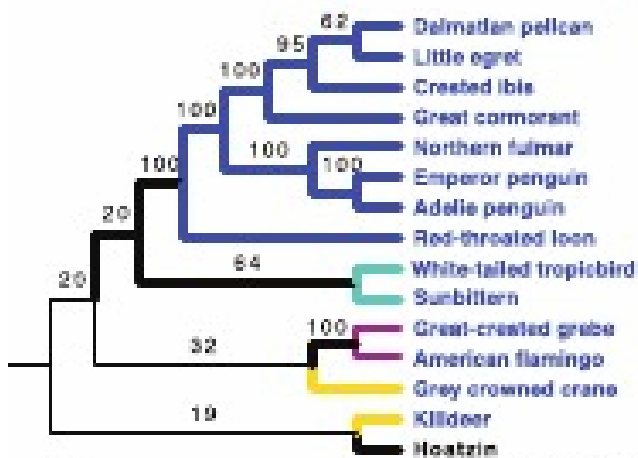
Pokud jde o absolutní počty mikrosatelitů, nejvíce polymorfních u potápky roháče pocházelo od zástupců řádu trubkonosí, dalšími řády respektive skupinami, které poskytly velké množství polymorfních mikrosatelitů byly veslonozí, brodiví, EST, plameňáci, tučňáci a CAM, naopak nejméně polymorfních mikrosatelitů u potápky roháče pocházelo od zástupců řádu dlouhokřídli a vrubozobí, což souvisí s tím, že od těchto dvou řádů byly testovány jen některé mikrosatelity a skutečnost, že řád vrubozobí je fylogeneticky velmi vzdálen od řádu potápky (Jarvis *et al.*, 2014).

Graf č. 3: Rozdělení polymorfních mikrosatelitů u potápky roháče podle řádů, pro které byly původně navrženy. Čísla v závorkách udávají počet polymorfních lokusů u vzhledem k jednotlivým řádům, z nichž pocházejí.

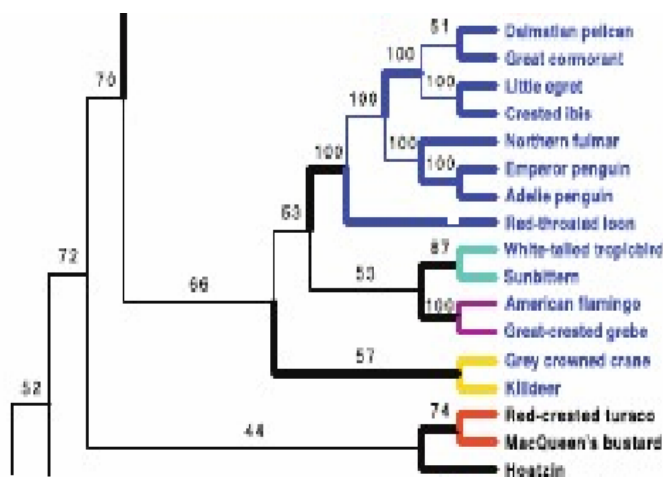


Nejnovější systémy založené na molekulárních datech vzniklých aproximací několika vybraných DNA lokusů vyčleňují řád potápky a plameňáky mimo veslonohé a brodivé, ale z hlediska *cross-species* testování (tato práce; Filipová, nepublikováno; Hoffmannová, 2013) je zřejmé, že mezi těmito skupinami by měla být větší příbuznost, než nejnovější fylogenetický strom založený na molekulárních datech ukazuje (Jarvis *et al.*, 2014). Jelikož jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace zjistila polymorfismus stejných mikrosatelitů u zástupců řádů trubkonosí i brodiví předpokládám, že nejbližší realitě jsou fylogenetické stromy odvozené od exonu c123 (viz Obr. 4) a exonu c12 (viz Obr. 5) (Jarvis *et al.*, 2014).

Obr. 4: Výsek fylogenetického stromu odvozeného od exonu c123, který řadí k sobě řady potápky, plameňáky, brodivé, veslonohé, trubkonosé, tučňáky a potáplice (Jarvis *et al.*, 2014).

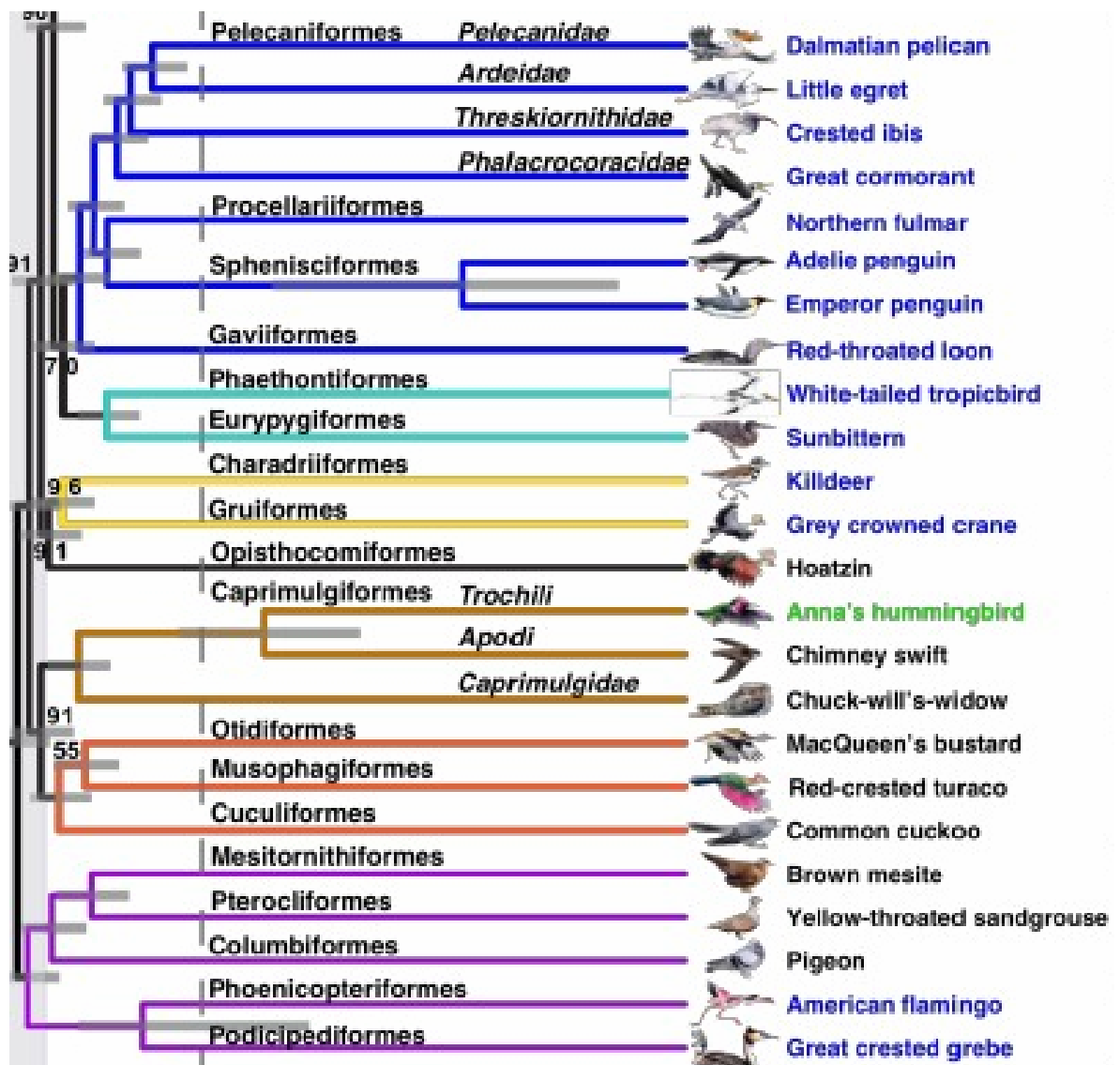


Obr. 5: Výsek fylogenetického stromu odvozeného od exonu c12 řadí potápky, plameňáky, brodivé, veslonohé, trubkonosé, tučňáky a potáplice k sobě (Jarvis *et al.*, 2014).



Toto jsou pouze dílčí fylogenetické stromy na základě exonů, který byly v článku použity, přičemž oba dva, byť se detailně liší, dávají dohromady potápky s velkými vodními ptáky, nicméně celkový fylogenetický strom založený na větším množství DNA sekvencí, zachovává sesterské zařazení potápek a plameňáků, ale obě tyto skupiny však řadí zcela pryč od zbytku velkých vodních ptáků (brodiví, veslonozí, trubkonosí, tučňáci a potáplice) (viz Obr. 6).

Obr. 6: Výsek celkového fylogenetického stromu zahrnujícího kromě exonů také introny a ultrakonzervativní elementy (UCE), který vyčleňuje řády potápky a plameňáci mimo od brodivých, veslonohých, trubkonosých, tučňáků a potáplic (Jarvis *et al.*, 2014).



7. Závěr

Ve své bakalářské práci jsem testovala celkem 213 mikrosatelitových lokusů. Z toho 207 bylo izolovaných od zástupců řádu trubkonosí (Procellariiformes), pět mikrosatelitů od zástupců řádů dlouhokřídlí (Charadriiformes) a jeden mikrosatelit od lesňáčka žlutohého z řádu pěvci (Passeriiformes) na polymorfismus u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) použitím *cross-species* PCR amplifikace. Konkrétně se jednalo o 53 mikrosatelitů izolovaných od různých druhů z čeledi albatrosovití (Diomedidae), 100 mikrosatelitů od zástupců čeledi buňňákovití (Procellariidae), 54 mikrosatelitů od zástupců čeledi buňňáčkovití (Hydrobatidae), po jednom mikrosatelitu od alkouna obecného z čeledi alkovití (Alcidae), kulíka mořského z čeledi kulíkovití (Charadriidae) a lesňáčka žlutohého z čeledi lesňáčkovití (Parulidae) a tři mikrosatelity od racka novozélandského z čeledi rackovití (Laridae).

Pomocí již zmíněné metody jsem u potápky roháče našla celkem dvacet polymorfních mikrosatelitů, přičemž všechny byly původně navrženy pro druhy z řádu trubkonosí. U těchto polymorfních lokusů jsem stanovila optimální teplotu nasedání primerů při PCR reakci (T_a), koncentraci hořčnatých iontů v PCR mixu a délku elektroforetické separace.

Největší úspěšnost (13 %) *cross-species* PCR amplifikace u potápky roháče vykazovaly mikrosatelity izolované od zástupců čeledi buňňákovití, kde ze 100 testovaných mikrosatelitů jich bylo 13 polymorfních. V rámci této čeledi byly nejlépe amplifikovány a poskytly polymorfní produkt mikrosatelity od buňňáka světlého (*Puffinus carneipes*), kdy z jedenácti testovaných mikrosatelitů bylo polymorfních pět z nich, tedy 45,5% úspěšnost. Největší počet alel jsem našla u mikrosatelitu O110-39 izolovaného od buňňáčka dlouhokřídlého (*Oceanodroma leucorhoa*), tento mikrosatelit měl u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče osm alel.

8. Seznam použitých zkratek

SSRs – *Simple Sequence Repeats* (jednoduché repetitivní sekvence)

DNA – *DeoxyriboNucleotic Acid* (deoxyribonukleová kyselina)

RAPD – *Randomly Amplified Polymorphic DNA*

EST – *Expressed Sequence Tags*

T_a – *Annealing Temperature* (teplota nasedání primerů při PCR reakci)

CAM – *Conserved Avian Microsatellite* (konzervované ptačí mikrosatelity)

UCE – *UltraConserved Elements* (ultrakonzervativní elementy)

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: <http://biomath.trinity.edu/manuscripts/10-6/mer-10-0209.pdf>

Armour, J. A. L., Neumann, R., Gobert, S., Jeffreys, A. J. (1994) Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. Human Molecular Genetics, 3: 599 – 605.

Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G. M., Bered, F., Fay, M. F., Lexer, C. (2007): Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Molecular Ecology, 16: 3759 – 3767.

Bicknell, A. W. J., Dawson, D. A., Horsburg, 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.

Bouck, A., Vision, T. (2007) The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. Molecular Ecology, 16: 907 – 924.

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

Bried, J., Andris, M., Dubois, M. P., Jarne, P. (2012) Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources, 9: 913 – 915.

- Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009) Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology*, 150: 925 – 929.
- Burg, T. M., (1999) Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology*, 8: 338 – 341.
- Burg, T. M., Croxall, J. P. (2001) Global relationships amongst blackbrowed and grey-headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. *Molecular Ecology*, 10: 2647 – 2660.
- Burg, T. M., Croxall, J. P. (2004) Global population structure and taxonomy of the wandering albatross species complex. *Molecular Ecology*, 13: 2345 – 2355.
- Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I. R. K., 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 petechia* (the yellow warbler), and their uses 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, A., Krupa, A. P., Lee, J. W., Martin-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L. G., Burke, T. (2010) New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10: 475 – 494.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, Ch. (1992) *Handbook of the birds of the world*, volume 1. Lynx, Barcelona.
- Dubois, M. P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005) Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, 5: 905 – 907.

Ellegren, H., Primmer, C. R., Sheldon, B. C. (1995): Microsatellite 'evolution': directionality or bias? *Nature Genetics*, 11: 361 – 362.

Fjeldsá, J. (1994): Potáplice a Potápky. In: Homolová, Š. (Ed.): *Obratlovci: savci, ptáci, obojživelníci, plazi: encyklopedický průvodce světem zvířat*. Nakladatelský dům OP, Praha.

Fjeldsá, J. (2004): *The Grebes (Podicipedidae)*. Oxford University Press, New York.

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

Friesen, V. L., Smith, A. L., Gómez-Díaz, E., Bolton, M., Furness, W., Gonzáles-Solís, J., Monteiro, L. R. (2007) Sympatric speciation by allochrony in a seabird. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 104: 18589 – 18594.

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

Garner, T. W. J. (2002) Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. *Genome*, 45: 212 – 215.

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*, 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. (2008) 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.

Hamilton, M. B., Pincus, E. L., Di Fiore, A., Fleischer, R. C. (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, 27:500 – 507.

Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2012) 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.

Hardy, O. J., Charbonnel, N., Fréville, H., Heuertz, M. (2003): Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. *Genetics*, 163: 1467 – 1482.

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.

Higgins, K., Lynch, L. (2001) Metapopulation extinction caused by mutation accumulation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 98: 2928 – 2933.

Hoffmannová, J. (2013) Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Hudec, K., Černý, W., a spol. (1972): Fauna ČSSR, Ptáci 1, Academia – nakladatelství Československé akademie věd, Praha.

Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y. W., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A., Weber, C. C., da Fonseca, R. R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W. C., Ray, D., Green, R. E., Bruford, M. W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y.,

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

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, A., Horsburgh, G. J., Kupper, C., Major, A., Lee, P. L. M., Hoffmann, G., Matics, R., Dawson, D. A. (2009) Microsatellite markers characterized in the barn owl (*Tyto alba*) and of high utility in other owls (Strigiformes: AVES). *Molecular Ecological Resources*, 9: 1513 – 1519.

Küpper, C., Horsburgh, 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, doktorská práce, Auckland, Nový Zéland.

Lim, K. Y., Kovarik, A., Matyasek, R., Chase, M. W., Clarkson, J. J., Grandbastien, M. A., Leitch, A. R. (2007) The sequence of events leading to *Nicotiana* genome turnover in less than five million years. *New Phytologist*, 175: 756 – 763.

Lynch, M., Conery, J. S. (2003) The origins of genome complexity. *Science*, 302: 1401 – 1404.

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

Megléc, 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.

Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimand, a G. K., Thali, M. R., Alderman, R., Cuthbert, R. J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Philips, R. A., Ryan, P. G., Suazo, C., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015) Evolutionary factor affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, Early View, publikováno online: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1755-0998.12372/pdf>

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.

Noor, M. A. F., Feder, J. L. (2006) Speciation genetics: evolving approaches. *Nature Reviews Genetics*, 7: 851 – 861.

Primmer, C. R., Møller, A. P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5: 365 – 378.

Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo J. U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36: 348 – 360.

- Quilfeldt, 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.
- Rassmann, K., Schlötterer, C., Tautz, D. (1991) Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12: 113 – 118.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener, S., Krawetz, S. A. (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 365 – 386.
- Schlötterer, C., Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 211 – 215.
- Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. *Molecular Ecology Resources* 9: 913 – 915.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): *Svět zvířat IV., Ptáci (1)*, Albatros, Praha.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (2006): *Atlas hnízdního rozšíření ptáků v ČR 2001 – 2003*. Aventinum, Praha.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004) Characterization of microsatellite loci in White-chinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes*, 4: 33 – 35.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011) Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources*, 5: 581 – 584.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1 – 16.

Zhu, Y., Strassmann, J. E., Queller, D., C. (2000): Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Conservation Genetics Resources*, 76: 227 – 236.