

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Vendula Kůrová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu
trubkonosí u plameňáka růžového
(*Phoenicopterus roseus*)**

Bakalářská práce

Vendula Kůrová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

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

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

V Olomouci dne 12. 5. 2017

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při zpracování teoretické i experimentální části mé bakalářské práce.

Souhrn

Tato bakalářská práce je zaměřena na nalezení polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace.

V rámci teoretické části jsem popsala řád plameňáci, čeleď plameňákovití a zabývala jsem se popisem a zařazením plameňáka růžového do systému. Dále se v této práci zabírám obecnou charakteristikou mikrosatelitů, jejich dělením, mutacemi a využitím. V závěru teoretické části se detailně zaměřuji na mikrosatelity, které byly polymorfní u druhů z řádu trubkonosí.

V praktické části jsem testovala na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového celkem 213 mikrosatelitových lokusů, které byly polymorfní u zástupců z řádu trubkonosí, přičemž 207 z nich bylo navrženo pro trubkonosé *de novo* a zbylých 6 bylo odvozeno od zástupců z řádů dlouhokřídlí a pěvci.

Všechny *cross-species* PCR amplifikace poskytly produkt. Celkem jsem našla 164 monomorfních mikrosatelitových lokusů, jeden nehodnotitelný polymorfní mikrosatelitový lokus a 48 polymorfních mikrosatelitových lokusů, které jsem genotypovala u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. U dvou mikrosatelitových lokusů jsem detekovala 2 polymorfní oblasti po 2 alelách.

Summary

This bachelor thesis is focused on finding polymorphic microsatellite loci in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*) using *cross-species* PCR amplification.

Within the theoretical part, I described the Phoenicopteriformes, the Phoenicopteridae, and I dealt with the description and classification of the Greater Flamingo into the system. In this part I also dealt with general characterization of microsatellites, their distribution, mutations and applications. At the end of the theoretical part, I focused on microsatellites which were polymorphic in species from the order of Procellariiformes.

In the experimental part I tested 213 microsatellite loci on DNA of 6 unrelated individuals of the Greater Flamingo, which were polymorphic in the order of Procellariiformes, 207 of them were designed for Procellariiformes and the remaining 6 microsatellites were derived from the orders of the Charadriiformes and the Passeriformes.

All cross-species PCR amplifications provided the product. Totally, I found 164 monomorphic microsatellite loci, one unscorable polymorphic microsatellite locus and 48 polymorphic microsatellite loci, which I genotyped in 6 unrelated individuals of Greater Flamingo. In two microsatellite loci, I detected two polymorphic regions of two alleles.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíle práce	8
3	Literární přehled	9
3.1	Řád plameňáci	9
3.2	Čeď plameňákovití	10
3.3	Plameňák růžový	11
3.3.1	Taxonomické zařazení plameňáka růžového	12
3.4	Mikrosatelity.....	12
3.4.1	Dělení mikrosatelitů	12
3.4.2	Mutace mikrosatelitů.....	13
3.4.3	Využití mikrosatelitů.....	14
3.4.4	Mikrosatelity a jejich <i>cross-species</i> PCR amplifikace u druhů třídy ptáci	15
3.4.5	Mikrosatelity izolované z řádu trubkonosí.....	16
3.4.5.1	Mikrosatelity z čeledi albatrosovití	17
3.4.5.2	Mikrosatelity z čeledi buňňákovití.....	19
3.4.5.3	Mikrosatelity z čeledi buňňákovití.....	21
4	Materiál a metody	29
4.1	Biologický materiál	29
4.2	Amplifikované mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového	29
4.3	PCR amplifikace DNA	32
4.4	Elektroforetická separace PCR produktů	33
4.5	Chemikálie.....	36
4.6	Roztoky.....	37
4.7	Laboratorní přístroje	39
5	Výsledky	40
6	Diskuze	50
7	Závěr	61
8	Seznam zkratk	62
9	Použitá literatura	63

1 Úvod

Mikrosatelity jsou sekvence DNA složené z tandemově se opakujících motivů o délce repetice 1–6 párů bází, které se vyskytují v prokaryotních i v eukaryotních organismech, a to v protein kódujících i nekódujících částech genomu. Mikrosatelity se vyznačují vysokým stupněm délkového polymorfismu, jsou hypervariabilní a hojně se vyskytující, proto jsou využívány jako genetické markery v mnoha odvětvích genetiky. Výskyt mutací v mikrosatelitech je značně vyšší než v nerepetitivních částech genomu. U druhů, u kterých nebyly mikrosatelity doposud testovány, se mikrosatelitové lokusy izolují *de novo*. Jelikož je tento postup zdlouhavý a nákladný, mezi úzce příbuznými druhy se pro hledání těchto variabilních markerů využívá také *cross-species* PCR amplifikace.

V této bakalářské práci se budu zabývat nalezením polymorfních mikrosatelitových lokusů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace s využitím všech doposud publikovaných párů primerů, které amplifikovaly polymorfní mikrosatelitové lokusy u zástupců z řádu trubkonosí (Procellariiformes). Většina primerů byla navržena pro řád trubkonosí *de novo* avšak několik párů z nich bylo původně navrženo pro zástupce z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pěvci (Passeriformes).

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) s využitím *cross-species* primerů pro mikrosatelity, které byly polymorfní u zástupců z řádu trubkonosí (Procellariiformes). Primery byly izolovány *de novo* od zástupců z řádu trubkonosí a několik z nich bylo původně izolováno od zástupců z řádu dlouhokřídlí a pěvci.

3 Literární přehled

3.1 Řád plameňáci

Řád plameňáci (Phoenicopteriformes) zahrnuje velké dlouhokrké a dlouhonohé vodní ptáky, kteří dosahují výšky 80–145 cm. Jejich hmotnost se nejčastěji pohybuje mezi 2–3 kg (Gosler, 1994, Gaisler *et Zima*, 2007). Mají oválné tělo a malou hlavu s výrazným zobákem. Charakteristickým znakem těchto ptáků je růžově až karmínově červeně zbarvené peří. Toto zbarvení, které hraje důležitou roli při rozmnožování, je způsobeno karotenoidními pigmenty produkovanými řasami, které plameňáci konzumují buď přímo filtrací z vody, anebo nepřímo obsažené v bezobratlých živočiších, kteří se těmito řasami živí. Tito ptáci jsou schopni karotenoidy rozkládat pomocí jaterních enzymů a převádět je na pro ně využitelné růžové pigmenty jako je kanthaxanthin, který je obsažen v peří, kůži i ve žloutku vejce (del Hoyo *et al.*, 1992).

Typický pro tento řád je silný dolů zahnutý zobák, který je přizpůsoben k filtrování potravy z vody. Na horní i dolní čelisti jsou vytvořeny dvě řady rohovitých lamel, kterými je pokryt i jazyk. Plameňáci nasávají vodu s bahnem a přes tyto rohovité lamely ji tlačí svým svalnatým jazykem, a tím z ní procezuji potravu – plankton, řasy, měkkýše a korýše (Gosler, 1994, Gaisler *et Zima*, 2007). Hlas plameňáků se u jednotlivých druhů liší, nejdůležitější roli hraje při udržování hejna pohromadě a také pro vzájemné rozpoznání rodičů a jejich potomků (del Hoyo, 1992). Nohy plameňáků jsou adaptovány na pohyb ve vodě. Jsou neopeřené, štíhlé, chůdovité a mají tři přední prsty, které jsou spojeny plovací blánou, což zaručuje dobrou stabilitu při brodění se vodou. Zadní prst je redukován (del Hoyo *et al.*, 1992, Gosler, 1994, Gaisler *et Zima*, 2007). V případě potřeby dokážou díky plovacím blánám velmi dobře plavat, čehož využívají pouze výjimečně (Gosler, 1994, Gaisler *et Zima*, 2007). Plameňáci jsou rychlími letci, dosahují rychlosti až 60 km/hod, při letu mají natažený krk a nohy jsou taženy pod tělem. Létají v hejnech, která se formují do V-formace nebo do řad. Křídla jsou krátká a špičatá, na jejich koncích rostou u všech druhů černé letky (del Hoyo *et al.*, 1992, Gaisler *et Zima*, 2007).

Tito ptáci tvoří monogamní páry. Hnízdí v koloniích v mělkých mořských zálivech a na vnitrozemských jezerech, kde si stavějí hnízda kuželovitého tvaru asi 30 cm vysoká a 30 cm široká. Jako stavební materiál využívají bahno, peří a okolní vegetaci (del Hoyo *et al.*, 1992, Gosler, 1994, Gaisler a Zima, 2007). Samice klade jedno, vzácněji dvě bílá vejce, na kterých po dobu inkubace sedí oba rodiče. Po 27–31 dnech se líhnou krmivá

mláďata šedivé barvy, která jsou krmena oběma rodiči obsahem volete po dobu asi 75 dní (del Hoyo *et al.*, 1992, Gosler, 1994).

Plameňáci se vyskytují na všech kontinentech s výjimkou Austrálie a Antarktidy. Mezi jejich typická stanoviště patří velká mělká jezera nebo laguny, která mohou být alkalická – dosahují pH 10,5 nebo zasolená, až dvakrát slanější než mořská voda. Plameňáci dobře snášejí drsné přírodní podmínky, dokáží žít ve vodním prostředí s velkým obsahem chloridů, uhličitanu sodného, síranů a fluoridů často v kombinaci s vysokými teplotami dosahujícími 68 °C i více. V takových vodách se vzhledem k nedostatku potravní konkurence hojně vyskytuje jejich potrava. Plameňáci dokáží přežít i drsné zimy v Andách, kdy mohou teploty dosahovat -30 °C, a to díky horkým vulkanickým pramenům, které nezamrzají a u kterých se plameňáci po dobu zimy zdržují. Limitujícím faktorem pro plameňáky není ani nadmořská výška, běžně se vyskytují až do 5000 m n. m. (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.2 Čeleď plameňákovití

Čeleď plameňákovití (Phoenicopteridae) je jedinou čeledí řádu plameňáci. Celkem do ní spadají tři rody *Phoenicopterus*, *Phoeniconaias* a *Phoenicoparrus*, které zahrnují pět druhů (del Hoyo *et al.*, 1992, Gosler, 1994), podle některých autorů však šest druhů (Gaisler a Zima, 2007, Torres *et al.*, 2014). Do rodu *Phoenicopterus* patří dle del Hoya *et al.* (1992) plameňák růžový (*P. ruber*) a plameňák chilský (*P. chilensis*). Del Hoyo *et al.* (1992) rozdělují druh plameňák růžový na dva poddruhy – plameňáka růžového (*P. ruber roseus*) a plameňáka karibského (*P. ruber ruber*). Jiní autoři (Gaisler a Zima, 2007, Torres *et al.*, 2014), stejně jako já v této bakalářské práci, řadí plameňáka růžového a karibského jako samostatné druhy – plameňák růžový (*P. roseus*) a plameňák karibský (*P. ruber*). Dalším rodem je *Phoeniconaias*, do kterého spadá pouze plameňák malý (*P. minor*) a do posledního třetího rodu *Phoenicoparrus* jsou řazeny dva druhy, a to plameňák andský (*P. andinus*) a plameňák Jamesův (*P. jamesi*) (del Hoyo *et al.*, 1992).

Torres *et al.* (2014) rozlišují dva klady plameňáků dle typu zobáku. První z kladů obsahuje druhy se zobákem uzpůsobeným k příjmu větší potravy a řadí se do něj plameňák růžový, karibský a chilský. Klad druhý zahrnuje druhy vyznačující se zobákem vhodným pro zachycení drobné potravy, konkrétně plameňáka andského, Jamesova a malého, který je v tradičních pracích (del Hoyo *et al.*, 1992) řazen dle unikátní stavby zobáku do samostatného rodu *Phoeniconaias*, zatímco zbylí dva jsou společně řazeni

do rodu *Phoenicoparrus* na základě absence zadního prstu na noze. Morfologické definice těchto rodů se však navzájem nevylučují, a proto Torres *et al.* (2014) zařazují plameňáka malého (*Phoeniconaias minor*) na základě mandibulární morfologie, ekologie a fylogenetické příbuznosti do rodu *Phoenicoparrus* jako *Phoenicoparrus minor*.

3.3 Plameňák růžový

Plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*) je nejznámější z šesti druhů řádu plameňáci (Gaisler *et Zima*, 2007). S výškou až 145 cm a hmotností dosahující 4,1 kg je považován za největšího ze všech plameňáků (del Hoyo *et al.*, 1992). Jeho peří je zbarveno růžově s šarlatově červenými a černými křídly (Černý, 1980), jak lze vidět na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*) (Bohdal, J., 2016, publikováno on-line na: <http://www.naturfoto.cz/plamenak-ruzovy-fotografie-25164.html>, navštíveno dne 27. 3. 2017).

Plameňáci růžoví se živí poměrně pestrou stravou, složenou z živočišné i rostlinné složky. Živočišná strava se skládá zejména z vodních bezobratlých, jako jsou korýši, měkkýši, kroužkovci a hmyz, včetně larev. Z rostlin se nejčastěji živí výhonky nebo

semeny vodních trav, také řasami či rozsivkami, někdy rozkládajícími se listy (del Hoyo *et al.*, 1992).

Plameňáci růžoví se vyskytují ve velkých početných koloniích (až do 200000 párů ptáků) v tropech i subtropích, zejména v jižní Francii, na jihu Španělska, v Africe, Indii a na Srí Lance. Obývají solné laguny a pánve, také mělká, vysoce alkalická nebo solná vnitrozemská jezera, písčiny či mělčiny v okolí řek (del Hoyo *et al.*, 1992). Počet kolonií plameňáka růžového se snižuje, některým dokonce hrozí zánik (Gaisler *et Zima*, 2007).

3.3.1 Taxonomické zařazení plameňáka růžového

Taxonomické zařazení plameňáka růžového dle BirdLife International (2016):

Nadříše:	Eukaryota
Říše:	Metazoa (živočichové)
Kmen:	Chordata (strunatci)
Třída:	Aves (ptáci)
Řád:	Phoenicopteriformes (plameňáci)
Čeleď	Phoenicopteridae (plameňákovití)
Rod:	<i>Phoenicopus</i> (plameňák)
Druh:	<i>Phoenicopus roseus</i> (plameňák růžový)

3.4 Mikrosatelity

Mikrosatelity, známé také jako SSRs (Simple Sequence Repeats), VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) nebo STRs (Short Tandem Repeats), jsou repetitivní sekvence DNA složené z tandemově se opakujících motivů o délce repetice 1–6 párů bází (Queller *et al.*, 1993, Selkoe *et Toonen*, 2006). Mikrosatelity se vyskytují v prokaryotních i v eukaryotních organismech, a to v protein kódujících i nekódujících částech genomu (Field *et Wills*, 1998, Schlötterer, 2000, Tóth *et al.*, 2000). Mikrosatelity se obvykle vyznačují vysokým stupněm délkového polymorfismu (Zane *et al.*, 2002).

3.4.1 Dělení mikrosatelitů

Tóth *et al.* (2000) dělí mikrosatelity podle délky jejich základní jednotky na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexa- nukleotidové repetice. Ve svém výzkumu uvádějí, že v exonech jsou obecně u všech taxonů nejvíce zastoupeny trinukleotidové repetice, druhé nejčetnější jsou potom repetice hexanukleotidové. Ostatní druhy repetice převažují

zejména v intronech a intergenových regionech, mnohem méně se vyskytují v kódujících oblastech. U primátů jsou například v nekódujících oblastech dominantní mononukleotidové repetice, u hlodavců a mnoha dalších taxonů dinukleotidové repetice.

Oliveira *et al.* (2006) rozdělují mikrosatelity dle typu opakování základního motivu na dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené. U dokonalých mikrosatelitů není opakovaná sekvence přerušena žádnou bází, která by neodpovídala základnímu motivu (např. TATATATATATATA), na rozdíl od nedokonalých mikrosatelitů, kde je vložen pár bází nepatřících do základní jednotky repetice (např. TATATATACTATATA). V případě přerušovaného mikrosatelitu je mezi jednotky repetice vložená krátká sekvence, která neodpovídá sekvenci základního motivu (např. TATATACGTGTTATATATA). Sekvence složených mikrosatelitů se skládá ze dvou rozdílných základních jednotek repetice, které spolu sousedí (např. TATATATATAGTGTGTGTGTGT).

3.4.2 Mutace mikrosatelitů

Výskyt mutací v mikrosatelitech se pohybuje v rozmezí 10^{-2} až 10^{-6} nukleotidů za jednu generaci a je tedy značně vyšší než výskyt substitucí jednotlivých bází (Schlötterer, 2000). Míra mutability je ovlivněna délkou mikrosatelitů i jejich jednotek repetice. Dlouhé mikrosatelity jsou vysoce nestabilní a výskyt mutací je zde velmi pravděpodobný (Lai *et al.*, 2003).

Hlavním mechanismem, který mutace mikrosatelitů způsobuje, je sklouznutí DNA polymerázy, označované jako *DNA replication slippage* (Schlötterer, 2000) nebo *DNA polymerase slippage* (Oliveira *et al.*, 2006). Sklouznutí DNA polymerázy během replikace DNA spočívá v přechodné disociaci řetězce DNA a zpětné reasociaci vlákna v jiných pozicích, což vede k chybám při párování bází a následně k prodlužování nebo zkracování nově vznikajícího vlákna (Tóth *et al.*, 2000, Oliveira *et al.*, 2006). Pokud dojde ke sklouznutí DNA polymerázy u mikrosatelitu složeného z krátkých jednotek, dochází častěji k navýšení počtu repetic, naopak jsou-li jednotky repetice dlouhé, pravděpodobně dojde ke zkrácení mikrosatelitu (Lai *et al.*, 2003). Dalším uváděným mechanismem vzniku mutace mikrosatelitů je nerovnoměrný crossing-over. Dojde-li k nerovnoměrnému crossing-overu, jsou mezi sebou vyměněny nestejně dlouhé části homologních chromozomů a jeden chromozom přijme fragment s větším počtem tandemových repetic než druhý (Oliveira *et al.*, 2006).

Změny v počtech trinukleotidových repetitivních mikrosatelitů mohou v lidské populaci vyvolat různá onemocnění. Jako příklad lze uvést Huntingtonovu chorobu, která je způsobena navýšením počtu CAG jednotek v příslušném genu na chromozomu 4 (Moxon *et al.*, 1999).

3.4.3 Využití mikrosatelitů

Během minulých let se s rozvojem polymerázové řetězové reakce (PCR) z mikrosatelitů staly populární genetické markery (Schlötterer, 2000), používané v mnoha odvětvích genetiky, jako je genomové mapování, lékařská, evoluční, ekologická (Primmer *et al.*, 1997) a populační genetiky (Primmer *et al.*, 2005). Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní (Zane *et al.*, 2002), hypervariabilní a hojně se vyskytující, a proto mají širokou škálu využitelnosti (Primmer *et al.*, 1996, Galbusera *et al.*, 2000). Vzhledem k tomu, že se alely liší v délce, mohou být rozlišeny například pomocí gelové elektroforézy, která umožňuje rychlou genotypizaci mnoha jednotlivců na mnoha lokusech (Selkoe *et al.*, 2006).

Hlavním limitujícím faktorem použití mikrosatelitů je, že u poprvé zkoumaných druhů musí být izolovány *de novo* (Zane *et al.*, 2002), vzhledem k nedostatku „univerzálních“ PCR primerů, které amplifikují homologní produkty napříč velkým rozsahem druhů (Primmer *et al.*, 2005). Navrhnutí „univerzálních primerů“ odpovídajících konzervovaným sekvencím je v tomto případě velmi problematické kvůli tomu, že mikrosatelity se ve větším počtu nacházejí spíše v nekódujících oblastech, kde dochází častěji k nukleotidovým substitucím než v oblastech kódujících (Zane *et al.*, 2002). Mikrosatelitové lokusy bývají tradičně izolovány z genomických knihoven cílových druhů pomocí vhodných sond (Rassman *et al.*, 1991). Genomická DNA je nejprve fragmentována buď pomocí restričních enzymů anebo sonikací. Fragmentovaná DNA je selektována na základě velikosti (300–700 bp) Fragmenty DNA jsou poté ligovány do běžných plazmidových vektorů, tím vzniknou tisíce rekombinantních klonů bakteriálních buněk, které jsou následně podrobeny screeningu na přítomnost mikrosatelitových repetitivních obvykle pomocí Southernova přenosu a následné hybridizace využívající sondy obsahující repetitivní sekvence. Pro následnou identifikaci klonů obsahujících repetitivní sekvence jsou navrženy specifické primery a jsou optimalizovány PCR podmínky pro umožnění amplifikace každého lokusu. Tento způsob však může být značně zdlouhavý a neefektivní u druhů s nízkou frekvencí mikrosatelitů, jako jsou právě

ptáci nebo rostliny. Proto jsou pro izolaci navrhovány další alternativní metody – např. modifikace RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), které jsou časově méně náročné a výrazně zvětšují výtěžnost izolace mikrosatelitových lokusů (Zane *et al.*, 2002).

Ačkoliv mikrosatelitové primery obecně nelze využít univerzálně, určitá míra amplifikace mikrosatelitů mezi úzce příbuznými druhy je možná – *cross-species* PCR amplifikace (Moore *et al.*, 1991, Schlötterer *et al.*, 1991). Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů a podíl polymorfních lokusů přímo souvisí s evoluční divergencí druhů, ze kterých byly mikrosatelitové lokusy izolovány (zdrojové druhy), a druhů, na které byly mikrosatelitové lokusy aplikovány (cílové druhy) (Primmer *et al.*, 1996, Galbusera *et al.*, 2000, Primmer *et al.*, 2005). Naakumulované mutace v sekvencích ohraničujících mikrosatelity mohou u jednoho druhu inhibovat amplifikaci s primery navrženými pro vzdáleně příbuzné druhy, jelikož PCR primery vyžadují vysoký stupeň homologie cílové sekvence ke správnému fungování (Primmer *et al.*, 1996). Primery, které úspěšně amplifikují u mnoha druhů, mají větší šanci být polymorfní (Galbusera *et al.*, 2000). Kromě evoluční vzdálenosti ovlivňují míru úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace a polymorfismu i další faktory – typ a velikost repetice, stupeň polymorfismu původních druhů, teplota PCR annealingu. Složené repetice jsou amplifikovány výrazně méně než dokonalé a nedokonalé repetice; zatímco dokonalé repetice jsou amplifikovány lépe než repetice nedokonalé. Toto může být ovlivněno testováním malého počtu mikrosatelitových složených repetit (Galbusera *et al.*, 2000). Primmer *et al.* (2005) uvádějí, že počet repetitivních jednotek mikrosatelitu ve zdrojovém druhu pozitivně koreluje s podílem druhů, které byly na tomto lokusu polymorfní, Galbusera *et al.* (2000) však dříve tuto souvislost nezaznamenali. Dále bylo pozorováno, že snižování teploty při PCR annealingu zvyšuje úspěšnost amplifikace a polymorfismu, a to nezávisle na fylogenetické příbuznosti mezi testovanými druhy (Primmer *et al.*, 2005).

3.4.4 Mikrosatelity a jejich *cross-species* PCR amplifikace u druhů třídy ptáci

Mikrosatelity jsou v genomu ptáků mnohem méně frekventované než u ostatních obratlovců. To lze vysvětlit tím, že ptačí genom obsahuje relativně malé množství nekódující DNA, ve které se mikrosatelity převážně vyskytují. Dále u ptáků nebyla zjištěna přímá asociace mikrosatelitů s krátkými rozptýlenými jadernými elementy (SINEs) na rozdíl od mnoha jiných taxonů (Primmer *et al.*, 1997).

Cross-species PCR amplifikované markery mohou být obzvláště užitečné právě pro studie ptáků, kteří mají ve svém genomu obsaženo asi desetkrát méně mikrosatelitů než například člověk (Primmer *et al.*, 1997). Primmer *et al.* (1996) se zabývali určením možného rozsahu využití systému mikrosatelitových markerů pro široký okruh druhů založený na amplifikaci primery navrženými pro jiné druhy. Použili 16 markerů, které testovali na 48 druzích ptáků (pěvců i „ne-pěvců“). Celkem detekovali 24 % případů úspěšné homologní *cross-species* PCR amplifikace, ze kterých 46 % vykazovalo polymorfismus. Pro identifikaci většího počtu *cross-species* PCR amplifikujících markerů, Galbusera *et al.* (2000) testovali 40 markerů (navržených pro 16 odlišných druhů) na 13 druzích ptáků. Úspěšnost amplifikace byla v tomto případě 84 %, to je podstatně více než v publikaci Primmer *et al.* (1996), což bylo způsobeno pravděpodobně optimalizováním podmínek PCR pro každou kombinaci primerů a druhu a také tím, že všechny primery byly navrženy pro pěvce a testovány pouze na pěvcích. Polymorfních lokusů bylo však méně, pouze 39 % ze všech amplifikujících se. Dawson *et al.* (2010) popsali jednoduchou metodu návrhu setů mikrosatelitových primerů s vysokou využitelností napříč širokou škálou druhů. Identifikovali konzervované mikrosatelitové lokusy pomocí hledání homologních EST mikrosatelitových sekvencí geneticky vzdálených skupin ptáků (hrabavých a „ne-hrabavých“), konkrétně zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura (*Gallus gallus*). Z 33 navržených primerů testovaných na 53 druzích ptáků se 100 % úspěšně amplifikovalo u pěvců a 99 % u „ne-pěvců“, z nichž polymorfismus potom vykazovalo průměrně 48 % lokusů u pěvců a 21 % u „ne-pěvců“.

3.4.5 Mikrosatelity izolované z řádu trubkonosí

Řád trubkonosí (Procellariiformes) zahrnuje přibližně 110 druhů, které jsou řazeny do 4 čeledí. Zatím bylo od druhů z řádu trubkonosí izolováno 207 polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených od 20 druhů řazených do 3 čeledí. Od 8 druhů z čeledi albatrosovití (Diomedidae) bylo doposud izolováno a charakterizováno 53 polymorfních mikrosatelitových lokusů, od 3 druhů patřících do čeledi buňáčkovití (Hydrobatidae) bylo popsáno 54 polymorfních mikrosatelitových lokusů a z čeledi buňákovití (Procellariidae) bylo prozatím izolováno 100 polymorfních mikrosatelitových lokusů od 9 druhů. Z čeledi buňíkovití (Pelecanoididae) nebyl doposud u jediného druhu *de novo* popsán žádný polymorfní mikrosatelitový lokus. Dále byly popsány mikrosatelitové lokusy původně navržené pro ptáky z řádu dlouhokřídlí a pěvci, které byly u trubkonosých polymorfní. Od dlouhokřídlých bylo úspěšně použito

5 takových mikrosatelitových lokusů od tří čeledí, přičemž 1 byl popsán u alkouna obecného z čeledi alkounovití, 1 byl popsán u kulíka mořského z čeledi kulíkovití a 3 byly odvozeny od racka novozélandského z čeledi rackovití. U pěvců byl popsán pouze 1 takový mikrosatelitový lokus, odvozený od lesňáčka žlutohého z čeledi lesňáčkovití.

3.4.5.1 Mikrosatelity z čeledi albatrosovití

Od 8 druhů z čeledi albatrosovití bylo prozatím izolováno a popsáno 53 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Burg (1999) izolovala a charakterizovala 26 mikrosatelitových lokusů od dvou druhů: albatrosa šedohlavého (*Diomedea chrysostoma*) a albatrosa stěhovavého (*D. exulans*). Genomická DNA albatrosa šedohlavého a stěhovavého byla štěpena restriční endonukleázou *AluI*. Dle velikosti tříděné fragmenty o délce 300–800 bp byly ligovány do plazmidu *SmaI*-cut pUC19 a transformovány do DH5 α *Escherichia coli*. Kolonie byly prověřovány za použití (AC)₁₅ syntetických oligonukleotidů. Druhá knihovna byla obohacena o AC a CTTT repete. Primery byly navrženy pro 31 mikrosatelitových sekvencí, ale pouze 26 z nich úspěšně amplifikovalo viditelný produkt. *Cross-species* screening byl proveden s použitím DNA z 50 jedinců albatrosa šedohlavého, 50 jedinců albatrosa stěhovavého a 90 jedinců albatrosa černobrvého (*Thalassarche melanophris*). Dvacet jedna lokusů bylo polymorfních u jednoho nebo více druhů. Pouze dva lokusy (Dc10 a Dc19) se neamplifikovaly na DNA albatrosa stěhovavého (*D. exulans*), avšak u zbývajících dvou druhů amplifikace úspěšně probíhala. Úroveň polymorfismu se ve všech případech pohybovala od 2 do 11 alel na lokus.

Burg *et* Croxall (2001) zkoumali strukturu populace albatrosa šedohlavého (*T. chrysostoma*) a albatrosa černobrvého (*T. melanophris*) pomocí mitochondriální DNA i analýzy mikrosatelitových lokusů. Při studiu použili již známé markery (Burg, 1999) a doposud nepublikovaný mikrosatelitový marker De35. Genomická DNA těchto druhů byla izolována ze vzorků krve konzervovaných v ethanolu za použití Chelexu (Walsh *et al.*, 1991). Z celkového počtu 37 izolovaných lokusů bylo dále 7 vybráno k analýze obou testovaných druhů. Tyto mikrosatelitové lokusy byly testovány na 765 jedincích albatrosa černobrvého, kde bylo detekováno 4–13 alel na lokus, a na 756 jedincích albatrosa šedohlavého, kde se počet alel pohyboval mezi 5–22 alelami na lokus.

Za použití mitochondriální DNA a 9 mikrosatelitových markerů studovali Burg *et Croxall* (2004) fylogenetické vztahy albatrosa stěhovavého (*D. exulans*), jižního (*D. antipodensis*) a Gibsonova (*D. gibsoni*). Mezi posledními dvěma jmenovanými autoři detekovali nízkou úroveň genetické diference. Dalším studovaným druhem byl albatros tristanský (*D. dabbenena*), který byl však v této studii analyzován pouze pomocí mitochondriální DNA. Celkem bylo odebráno 772 vzorků krve dospělým jedincům, genomická DNA byla izolována ze vzorků krve konzervovaných v ethanolu pomocí Chelex extrakce (Burg *et Croxall*, 2001). Byly využity již známé mikrosatelitové markery (Burg, 1999) a byl také použit jeden doposud nepopsaný De37. De33 nebyl nakonec zařazen do testování diferenciací populací vzhledem k tomu, že u něj byla zjištěna vazba na pohlaví. Testování probíhalo u 649 jedinců albatrosa stěhovavého, 60 jedinců albatrosa jižního a 63 jedinců albatrosa Gibsonova. Počet detekovaných mikrosatelitových alel u těchto druhů se pohyboval mezi 2–21 na lokus.

Dubois *et al.* (2005) popsali 10 nových variabilních dinukleotidových mikrosatelitů u albatrosa stěhovavého (*D. exulans*) v rámci populační studie. DNA byla extrahována z jednotlivých vzorků krve albatrosů s využitím QIAmp Tissue Kit (QIAGEN), poté proběhla izolace mikrosatelitů ze sestavených knihoven, která byla provedena za použití biotinem značených mikrosatelitových sond a streptavidinem potažených magnetických kuliček. Po štěpení restrikčním enzymem nebyla provedena selekce fragmentů na základě velikosti, byly využity XL10 ultrakompetentní buňky (Gold ultracompetent cells). Rekombinantní klony byly prověřovány pomocí TC₁₀, TG₁₀, AGE1 a AGE2 oligonukleotidů a inzerty pozitivních kolonií buněk byly sekvenovány. Devadesát čtyři sekvencí obsahovalo repetitivní oblast i ohraničující regiony vhodné pro navržení PCR primerů. Pro další amplifikace bylo využito 15 lokusů, které obsahovaly největší počet nepřerušovaných repetitivních sekvencí. PCR byla provedena samostatně pro každý lokus a poté multiplexována na dvě sady mikrosatelitových lokusů. Variabilita byla sledována ve třech populacích albatrosa stěhovavého, každá z nich zahrnovala 20 jedinců. Deset z 15 lokusů vykazovalo polymorfismus, bylo detekováno 2 až 13 alel na lokus.

Pro studium tří ohrožených druhů albatrosů severního Pacifiku Hernandez *et al.* (2014) navrhli a charakterizovali 15 polymorfních mikrosatelitových markerů. Pro extrakci genomické DNA pomocí DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) využili svalovou tkáň z albatrosa černonohého (*Phoebastria nigripes*), laysanského (*P. immutabilis*) a bělohřbetého (*P. albatrus*) a připravili genomovou knihovnu pomocí NEB Next® Ultra™ DNA

Library prep Kit for Illumina® a NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina. Pro další postup vybrali dle různých kritérií 44 vhodných potencionálně se amplifikujících lokusů obsahujících di-, tri- nebo teranukleotidové repetice, pro které byly navrženy primery v programu Primer 3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Pro srovnání velikostí ampliconů bylo těchto 44 lokusů testováno na 4 stejných vzorcích genomické DNA. Poté použili Multiplex Manager k vybrání 16 z těchto lokusů, které dále testovali v multiplexových reakcích na 51 jedincích – 36 černonohých, 12 laysanských a 3 bělohřbetých albatrosech. Z 16 testovaných párů primerů bylo 13 polymorfních u albatrosa černonohého a laysanského s 2–18 alelami a 14 bylo polymorfních u albatrosa bělohřbetého s 2–5 alelami na lokus.

3.4.5.2 Mikrosatelity z čeledi buřňáčkovití

Od 3 druhů z čeledi buřňáčkovití bylo doposud izolováno a popsáno 54 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Sun *et al.* (2009) navrhli primery pro 10 mikrosatelitových lokusů u dvou druhů: buřňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*) a buřňáčka dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*). Genomová knihovna byla konstruována ze 7 zmražených vzorků krve buřňáčka madeirského pocházejících z Japonska (Friesen *et al.*, 2007) za použití klonování (Glenn *et Schable*, 2005). DNA byla štěpena restričním enzymem *AluI*, byly vybrány fragmenty o velikosti od 200 do 1200 bp, které byly defosforylovány, pročištěny za použití QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) a ligovány do univerzálních SNX linkerů (Glenn *et Schable*, 2005). Ligovaný produkt byl hybridizován se směsí 3 biotinylovaných oligonukleotidových sond: (AC)₁₃, (AG)₁₃ (GAA)₈. DNA byla izolována pomocí streptavidinem potažených kuliček DynaBeads (DynaL Biotech). DNA obsahující mikrosatelity byla amplifikována s použitím SNX-F primeru, ligována do PCR 2.1-TOPO vektoru (Invitrogen) a transformována do TOP 10 One Shot *E. coli* kompetentních buněk (Invitrogen). Buňky byly pěstovány na agarových plotnách obsahujících ampicilin a testovány na mikrosatelity pomocí DIG fluorescence kit (Roche Diagnostics). Knihovna byla sestavena z 96 obohacených klonů, z nichž bylo 53 klonů sekvenováno. U bakteriálních kolonií byla provedena lyze varem a za daných podmínek byly amplifikovány inserty. PCR produkty byly sekvenovány s M13 primery na ABI 3730XL automatizovaném sekvenátoru. Ze 46 klonů obsahujících mikrosatelity, 9 obsahovalo 9 nebo více jednoduchých repetic a vhodné ohraničující sekvence pro navržení primerů.

Primery byly navrženy v softwaru Primer 3 (Rozen *et* Shaletsky, 2000). Genomová knihovna byla sestavena také ze dvou zmrazených vzorků tkáně buňňáčka dlouhokřídleho z Newfoundlandu, které byly prověřovány na dinukleotidové repetice. Sekvenováno bylo celkem 21 klonů, ze kterých pouze dva obsahovaly 9 nebo více repetic a vhodné ohraničující sekvence pro navrzení primerů. Ačkoliv primery byly navrženy pro oba lokusy, amplifikace probíhala pouze u jednoho. Variabilita všech 10 navržených lokusů byla testována na vzorcích 27 jedinců buňňáčka madeirského, 22 jedinců buňňáčka Monteirova a 24 jedinců buňňáčka dlouhokřídleho. Všechny 10 lokusů se úspěšně amplifikovalo u buňňáčka madeirského a Monteirova, 9 z nich bylo polymorfních. U buňňáčka dlouhokřídleho se úspěšně amplifikovalo pouze 8 lokusů, polymorfních bylo v tomto případě 6 lokusů. Počet alel se u všech druhů pohyboval od 2 do 11 na lokus. *Cross-species* PCR amplifikace byla také testována na jednom vzorku krve buňňáčka galapážského (*O. tethys*) a buňňáčka límcového (*O. hornbyi*) a šesti vzorcích buňňáčka tmavohřbetého (*Pterodroma phaeopygia*) z čeledi buňňákovití, kde byly až na lokusy Oc64B a Oc79-2 u všech lokusů získány produkty amplifikace. Zda byly lokusy polymorfní a s jakým počtem alel autoři neuvádějí.

Bicknell *et al.* (2011) popsali 26 mikrosatelitových lokusů u buňňáčka dlouhokřídleho. Ve svém výzkumu testovali také již objevené mikrosatelitové markery, konkrétně 7 lokusů izolovaných z dalších druhů buňňáčkovitých (Sun *et al.*, 2009) a 47 lokusů vykazujících vysokou mezidruhovou přenosnost (Klein *et al.*, 2009, Dawson *et al.*, 2010). Genomická DNA byla izolována ze vzorků krve metodou srážení za použití octanu amonného. Knihovna byla obohacena o motivy (GT)_n, (CT)_n, (GTAA)_n, (CTAA)_n, (TTTC)_n a (GATA)_n, které byly vázány na magnetické kuličky (Glenn *et* Schable, 2005). Transformované kolonie byly sekvenovány. Celkem bylo izolováno 211 nových unikátních mikrosatelitových sekvencí, pro 50 z nich byly navrženy primery v programu Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Nové i existující lokusy byly nejprve testovány na úspěšnost amplifikace a polymorfismus u 4–6 nepříbuzných jedinců buňňáčka dlouhokřídleho pro optimalizování PCR podmínek, za použití gradientu 12 různých annealingových teplot (56–65 °C). Annealingová teplota, při které se nejlépe amplifikoval PCR produkt, byla vybrána pro amplifikaci polymorfního lokusu na 24 nepříbuzných jedincích. Ze 47 známých lokusů testovaných na 6 jedincích, se 2 lokusy neamplifikovaly nebo produkovaly nespecifický produkt, 30 bylo monomorfních a 15 polymorfních. Z nově navržených 50 lokusů testovaných

na 4–6 jedincích se 6 lokusů neamplifikovalo nebo produkovalo nespecifický produkt, 18 lokusů bylo monomorfních a 26 polymorfních. Celkem 41 polymorfních lokusů testovaných na 24 nepříbuzných jedincích (14 samců a 10 samic) produkovalo od 2 do 22 alel na lokus. Čtyři lokusy vykazovaly vazbu na Z chromozom.

Bried *et al.* (2012) popsali 18 nových variabilních mikrosatelitů u buňňáčka Monteirova. DNA byla izolována z jednotlivých vzorků krve za použití QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitové lokusy byly izolovány ze sestavených genomových knihoven které byly sekvenovány. Ponechány byly sekvence o délce od 80 do 469 bp, které obsahovaly mikrosatelitové motivy delší než 5 repetice, celkem bylo tedy detekováno 754 sekvencí, ze kterých bylo pro další analýzu použito 27 s nejvyšším počtem nepřerušených repetice. Kvůli problémům při amplifikaci bylo vybráno pouze 18 mikrosatelitových lokusů, u kterých byla provedena PCR reakce nejprve samostatně pro každý lokus a poté byla multiplexována pro 3 sady mikrosatelitových lokusů. Variabilita byla testována na 125 dospělých jedincích buňňáčka Monteirova. Bylo detekováno 4 až 17 alel na lokus. Lokus Omn23 se jevil jako na pohlaví vázaný, jelikož žádná z 65 testovaných samic nebyla na tomto lokusu heterozygotní. Dále u těchto 18 markerů provedli *cross-species* PCR amplifikaci u buňňáčka madeirského a u ptáků spadajících do čeledi buňňákovití – buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) a buňňáka modravého (*Halobaena caerulea*). *Cross-species* PCR amplifikace byla nejúspěšnější u buňňáčka madeirského, kde se amplifikovaly všechny lokusy (18) a 17 z nich vykazovalo polymorfismus se 2 až 6 alelami. U buňňáka Bulwerova se amplifikovalo 7 lokusů, ze kterých byly 2 polymorfní se 2 alelami. Nejméně mikrosatelitů (6) se amplifikovalo u buňňáka modravého a 2 z nich byly polymorfní se 3 a 6 alelami.

3.4.5.3 Mikrosatelity z čeledi buňňákovití

Od 9 druhů z čeledi buňňákovití bylo doposud *de novo* izolováno a popsáno 100 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Dále bylo nalezeno i 5 mikrosatelitových lokusů izolovaných od ptáků z řádu dlouhokřídlí a 1 od zástupce z řádu pěvci, které byly u buňňákovitých polymorfní

Šest polymorfních dinukleotidových mikrosatelitových markerů ohroženého buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*) izolovali a charakterizovali Techow *et O’Ryan* (2004). DNA extrahovali fenol-chloroformovou extrakcí a srážením v ethanolu z tkáně štěpené pomocí proteinázy K odebrané uhynulým buňňákům bělobradým zachyceným

do rybářských sítí. Knihovna obohacená o CA motivy byla konstruována z DNA pěti jedinců za využití PCR pomocí degenerovaných oligonukleotidových primerů (DOP-PCR). PCR produkty byly hybridizovány na biotinylované CA repetitivní sondy navázané na streptavidin MagneSphere® paramagnetické částice (Promega). Obohacené fragmenty byly klonovány za použití Promega pGEM-T-Easy Vector System. Buňky byly vysety na selektivním médiu obsahujícím ampicilin a X-gal, bílé kolonie byly odebrány a naočkovány do 96jamkové mikrotitrační destičky, ve které byl obsažen ampicilin-LA. U klonů byla provedena dot-blot hybridizace na Hybond N⁺ membránách (Amersham Pharmacia) a poté byly prověřovány na přítomnost inzertů. Pozitivní klony byly amplifikovány pomocí PCR reakce s M13 primery. Plazmidy izolované z pozitivních klonů byly sekvenovány pomocí MegaBACE 500 Molecular Dynamics (Amersham Biosciences). Z 21 sekvenovaných rekombinantních plazmidů 17 obsahovalo mikrosatelity a 2 lokusy byly sekvenovány dvakrát. Primery byly navrženy pro 10 mikrosatelitů, které ohraničovaly vhodné sekvence, pomocí DNAMAN verze 4.13 (Lynnon Biosoft). Variabilita každého z 10 mikrosatelitových lokusů byla testována na nejméně 68 jedincích buňáka bělobradého, u 6 z 10 lokusů byl u zdrojového druhu detekován polymorfismus. U tří testovaných populací se počet alel pohyboval od 3 do 9 na lokus. Zbylé 4 lokusy byly monomorfní, avšak u buňáka obrovského (*Macronectes giganteus*) a Hallova (*M. hallis*) byl jeden z nich (Paequ4) polymorfní. Těchto celkem 7 mikrosatelitových lokusů (6 polymorfních u buňáka bělobradého a jeden polymorfní u buňáka obrovského a Hallova) bylo poté testováno na 6 dalších druzích: buňákovi tristanském (*P. conspicillata*), buňákovi obrovském, buňákovi Hallově a také na druzích z čeledi albatrosovití – albatrosovi stěhovaném, šedohlavém a černobrvém. Polymorfismus napříč těmito druhy vykazovalo 1–6 lokusů, přičemž nejvíce polymorfních lokusů (6) bylo detekováno u buňáka tristanského, naopak nejméně (1) u albatrosa stěhovavého. Počet alel u *cross-species* PCR amplifikací zde autoři neuvádějí.

Bried *et al.* (2007) popsali 11 variabilních dinukleotidových mikrosatelitů u buňáka šedého (*Calonectris diomedea*). DNA byla extrahována ze vzorků krve pomocí QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitové lokusy byly izolovány z obohacených (GCC₆, TA₁₀, CG₁₀ a TG₁₀) genomických knihoven za použití biotinem značených mikrosatelitových sond, streptavidinem potažených magnetických kuliček a XL10 Gold ultrakompetentních buněk (Dubois *et al.*, 2005). Rekombinantní klony byly prověřovány

pomocí TC₁₀ a TG₁₀ a AGE1 a AGE2 oligonukleotidů (Dubois *et al.*, 2005). Celkově bylo prověřeno 3036 klonů, ze kterých dávalo pozitivní signál 297, a 262 z nich bylo sekvenováno pomocí ABI3100 sekvenátoru (Applied Biosystems). Sto třicet dva sekvencí obsahovalo zároveň mikrosatelitovou sekvenci i ohraničující regiony vhodné pro navržení primerů. Primery byly navrženy pro 15 lokusů, které obsahovaly nejvíce nepřerušovaných mikrosatelitových repetic. PCR reakce byla provedena nejprve samostatně pro každý lokus a poté byla provedena multiplex PCR pro tři skupiny lokusů. Variabilita těchto lokusů byla sledována na 43 jedincích buřňáka šedého. Jedenáct z 15 lokusů vykazovalo polymorfismus, bylo detekováno 2 až 8 alel na lokus. U lokusu Cd4 byla zjištěna vazba na pohlaví, jelikož nebyl heterozygotní u žádné z 23 testovaných samic. Dále byla provedena *cross-species* PCR amplifikace těchto 11 mikrosatelitových lokusů na dalších třech druzích. Polymorfismus vykazovalo celkem 8 mikrosatelitových lokusů u buřňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), 2 lokusy u buřňáka bělobradého a 1 lokus u albatrosa stěhovavého patřícího do čeledi albatrosovití. Počet alel u *cross-species* PCR amplifikací u těchto 3 jmenovaných druhů autoři neuvádějí.

Gonzales *et al.* (2008) izolovali a charakterizovali 10 nových polymorfních mikrosatelitových lokusů u kriticky ohroženého buřňáka baleárského (*Puffinus mauretanicus*). Byly sestaveny dvě knihovny obohacené o CA a AAAG repetitivní sekvence. Genomická DNA byla extrahována ze vzorků svalů uchovávaných v ethanolu a štěpených proteinázou K pomocí fenol-chloroformové metody, štípána restrikcními enzymy *RsaI* a *XmnI*, ligována do univerzálních SNX adaptérů (Hamilton *et al.*, 1999) a poté byla biotinylovaná DNA ligována do pGEM-T Easy vektoru (Promega). Přibližně 850 transformovaných kolonií bylo hybridizováno pomocí CA a AAAG sond, pozitivní kolonie byly detekovány pomocí chemiluminiscence (CDP-Star detection kit, Sigma). Celkem bylo sekvenováno 162 klonů za pomoci univerzálních M13 primerů na ABI PRISM 3730 automatizovaném sekvenátoru (Applied Biosystems) s ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready (verze 3.0) a dohromady 108 z nich obsahovalo mikrosatelity. Dvacet tři mikrosatelitových sekvencí bylo vybráno pro navržení primerů v programu Primer 3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) a 19 z nich bylo úspěšně amplifikováno. Polymorfismus těchto mikrosatelitových lokusů byl hodnocen na 55 jedincích buřňáka baleárského, vykazovalo ho pouze 10 z navržených lokusů s počty alel pohybujícími se od 2 do 10. Jeden z nich (Puff Sma6) byl označen jako na pohlaví vázaný, je lokalizovaný na chromosomu W, a proto se amplifikuje pouze u samic. Pomocí *cross-species* PCR

amplifikace bylo těchto 10 mikrosatelitových lokusů testováno na 23 buňkách středomořských (*P. yelkouan*). Jeden lokus byl monomorfní, u zbylých 9 se počet alel pohyboval ve stejném rozmezí jako u zdrojového druhu.

Při studiu kriticky ohroženého buňáka taiko (*P. magentae*) Lawrence (2008) popsala dva nové mikrosatelitové markery. DNA byla izolována ze vzorků krve pomocí štěpení proteinázou K a následnou fenol-chloroformovou metodou. Byla sestavena genomická knihovna obohacená o GT/CA, GA/CT, AAT/TTA, AAAG/TTTC a GATA/CTAT repetice. Celkově bylo na přítomnost inzertu obsahujícího mikrosatelity prověřeno 2016 klonů, 178 klonů inzert obsahovalo a bylo sekvenováno. Devadesát devět z nich obsahovalo mikrosatelitovou DNA, avšak pouze 9 bylo ohraničeno vhodnými sekvencemi pro navržení primerů v programu Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Úspěšně se amplifikovaly 4 lokusy, pro další analýzy byl vybrán pouze jeden polymorfní lokus Tch6. Z dalších 9 lokusů, pro které byly navrženy primery, byl pro další využití vybrán polymorfní lokus Tch 25. Tch6 byl testován na 143 jedincích buňáka taiko, vyskytovaly se dvě alely. Tch 25 byl testován na 141 jedincích a počet alel byl 4. K testování bylo dále použito 22 mikrosatelitových markerů navržených pro jiné druhy ptáků. Čtrnáct se úspěšně amplifikovalo a 6 bylo polymorfních: Paequ3, Paequ8 a Paequ13 (Tehow *et* O’Ryan, 2004), RBG18 a RBG29 izolované od ptáků z řádu dlouhokřídlí (Given *et al.*, 2002) a De33 (Burg, 1999). Testováno bylo nejméně 142 jedinců z jednotlivých druhů a počet alel se napříč druhy pohyboval od 2 do 9.

Brown *et* Jordan (2009) izolovali 6 mikrosatelitových lokusů od buňáka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*). Celková genomická DNA byla izolována ze vzorků tkáně tří uhynulých mláďat pomocí fenol-chloroformové metody. Byla sestavena genomická knihovna obohacená o CA a CAGA repetice, fragmenty o velikosti 500–1000 bp byly klonovány za použití Original TA Cloning Kit (Invitrogen). Pozitivní klony byly prověřovány na inzerty obsahující CA a CAGA repetice, plazmidy obsahující inzert byly poté sekvenovány za využití M13 primerů a BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems). Páry primerů byly navrženy v softwaru Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Testování na polymorfismus bylo prováděno samostatně pro každý lokus, celkem z 43 testovaných lokusů amplifikovalo u 340 jedinců buňáka trinidadského produkt 6 párů primerů, pouze 3 lokusy byly polymorfní, počet alel se pohyboval od 4 do 10. Zbylé tři mikrosatelity byly u buňáka trinidadského monomorfní, polymorfismus však vykazovaly u některého ze 17 testovaných druhů z řádu trubkonosí

(viz dále). Všech 6 lokusů bylo dále testováno pomocí *cross-species* PCR amplifikace na dalších 17 druzích z řádu trubkonosí a jednoho druhu z řádu tučňáci (tučňák žlutorohý, *Eudyptes chrysolophus*). Genotypováno bylo 1–17 jedinců. Parm01 vykazoval polymorfismus u 13 testovaných druhů s počty alel od 2 do 9, Parm02 vykazoval polymorfismus u 5 testovaných druhů s počty alel od 2 do 5, Parm03 byl polymorfní u 6 testovaných druhů s počty alel 2 až 6, Parm04 byl polymorfní u 4 testovaných druhů s počty alel od 2 do 4, Parm05 byl polymorfní u 3 testovaných druhů s počty alel od 2 do 3 a Parm06 vykazoval polymorfismus u 6 testovaných druhů vždy se 2 alelami. U buňáka trinidadského byla také prováděna *cross-species* PCR amplifikace s primery navrženými pro 53 mikrosatelitových lokusů izolovaných z jiných druhů ptáků. Celkem bylo detekováno 6 polymorfních lokusů: Paequ3 a Paequ13 původně navržené pro buňáka bělobradého (Techow *et* O'Ryan, 2004), 10C5 a 12H8 izolované z albatrosa stěhovavého (Dubois *et al.*, 2005), De11 izolovaný z albatrosa šedohlavého (Burg, 1999) a Calex-01 navržený pro kulíka mořského (*Charadrius alexandrinus*) z řádu dlouhokřídlí (Küpper *et al.*, 2007). Počet alel se u buňáka trinidadského pohyboval mezi 2 a 5 na lokus.

Andris *et al.* (2010) popsali 11 nových dinukleotidových mikrosatelitů u buňáka Bulwerova. DNA byla extrahována z jednotlivých vzorků krve za použití QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitové lokusy byly izolovány z obohacené (TG₁₀, TC₁₀) knihovny za použití biotinem značených mikrosatelitových sond, streptavidinem potažených magnetických kuliček a JM 09 vysoce účinných kompetentních buněk. Rekombinantní klony byly testovány na TG₁₀, TC₁₀ a AGE 1 nebo AGE 2 oligonukleotidy za použití modifikované PCR (Dubois *et al.*, 2005). Celkem bylo prověřeno 768 klonů, ze kterých 392 dávalo pozitivní signál, a 352 z nich bylo sekvenováno pomocí ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Mikrosatelitové sekvence a vhodné ohraničující regiony obsahovalo celkem 282 sekvencí, 25 z nich s nejvyšším počtem nepřerušovaných mikrosatelitových repetitiv bylo dále využito. PCR reakce byla nejprve provedena pro každý lokus zvlášť, a potom probíhala ve 3 multiplexech. Variabilita těchto mikrosatelitových lokusů byla testována na 91 dospělých jedincích buňáka Bulwerova. Z 25 lokusů bylo na základě problémů s amplifikací a heterozygotností vybráno 11 mikrosatelitových lokusů. Bylo detekováno 2 až 8 alel na lokus. Bb11 byl určen jako vázaný na pohlaví, jelikož nebyl heterozygotní ani u jediné ze 44 testovaných samic. *Cross-species* PCR amplifikace těchto 11 mikrosatelitů byla testována na dalších

3 druhů z řádu trubkonosí: na buňňákově bělobradém, kde bylo 6 lokusů polymorfních, na buňňákově modravém (*Halobaena caerulea*), kde bylo polymorfních 10 z testovaných mikrosatelitových lokusů, a mimo to na buňňáčkově Monteirově z čeledi buňňáčkovití, kde bylo polymorfních pouze 5 lokusů z 11 testovaných. U testování *cross-species* PCR amplifikací u výše zmíněných druhů autoři neuvádějí počet alel.

Welch *et* Fleischer (2011) popsali 10 nových polymorfních mikrosatelitových lokusů izolovaných od buňňáka havajského (*Pterodroma sandwichensis*). Genomická DNA byla extrahována ze vzorků tkáně jednoho samce a jedné samice, poté byla štěpena na fragmenty 200–1000 bp. Fragmenty byly ligovány do SNX linkerů a poté amplifikovány, následně byly obohaceny mikrosatelitovými repeticemi hybridizací se sondami (CA)₁₀, (AAAG)₅, (AAAC)₅ nebo (AGAGG)₅. Fragmenty byly znovu amplifikovány a ligovány do pBluescript II SK + plazmidů, a poté transformovány do ultrakompetentních *E. coli*. Přibližně 1400 pozitivních kolonií bylo prověřováno, 65 z nich obsahovalo dostatečný počet mikrosatelitových repetic a ohraničující sekvence vhodné pro návrh primerů. Primery byly navrženy pro 54 klonů za použití programu Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Kromě navržených primerů testovali u buňňáka havajského také 37 již publikovaných primerů na *cross-species* PCR amplifikaci (Techow *et* O'Ryan, 2004, Bried *et al.*, 2008, Brown *et* Jordan, 2009, Gonzalez *et al.*, 2009), stejně jako jednotlivé lokusy RBG18, RBR18M, RBG29 a Dpμ01 (izolované z řádů dlouhokřídlí a pěvci) a Dc16, které byly shledány jako polymorfní u buňňáka tmavohřbetého (*P. phaeopygia*) (Dawson *et al.*, 1997, Burg, 1999, Given *et al.*, 2002, Friesen *et al.*, 2006). Mikrosatelity byly nejprve testovány na polymorfismus na 15 jedincích. Z celkem 91 amplifikovaných mikrosatelitů bylo polymorfních 10 nově navržených a 10 již publikovaných lokusů a byly poté genotypovány na vzorku 40 jedinců. Z nově izolovaných mikrosatelitových lokusů nebyl žádný vázaný na pohlaví, počet alel se pohyboval od 3 do 10. U již známých mikrosatelitových lokusů testovaných *cross-species* PCR amplifikací na buňňákově havajském se počet alel pohyboval mezi 3 a 14 alelami na lokus.

Při studiu mimopárového páření u buňňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*) Quillfeldt *et al.* (2012) navrhli 7 variabilních mikrosatelitových markerů. Genomická DNA byla extrahována pomocí DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) ze vzorků peří 25 dospělých jedinců a ze vzorků krve 43 dospělých jedinců a 34 mláďat. PCR amplifikace, izolace mikrosatelitů a klonování bylo provedeno, jak je popsáno v Klauke *et al.* (2009). Sedm

z navržených páru primerů amplifikovalo kvalitní PCR produkty, které zároveň vykazovaly polymorfismus na 10 jedincích a dále byly genotypovány na větším vzorku populace (68 dospělých jedinců). Detekováno bylo 5 až 16 alel. Z testování otcovství byly vyloučeny dva lokusy, konkrétně Patbel2 a Patbel5. U Patbel2 bylo detekováno celkem 16 alel, avšak podobnost některých alel zvyšovala pravděpodobnost chyby při hodnocení. Patbel5 byl homozygotní u všech testovaných samic, tudíž je pravděpodobně vázán na chromozom Z.

Hardesty *et al.* (2013) izolovali 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů od buřňáka světlého (*Puffinus carneipes*). DNA byla extrahovaná z krve pomocí QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). DNA byla štípána 7 restrikčními enzymy (*RsaI*, *HaeIII*, *BsrB1*, *PvuII*, *StuI*, *SeaI* a *EcoRV*). Fragmenty dlouhé 300–750 bp byly naligovány na adaptor a zachyceny pomocí biotinylovaných magnetických kuliček. Genomické knihovny byly sestaveny pomocí biotinem značených sond: (AAC)₁₂, (CAG)₁₀, (CATC)₈ a (TAGA)₈. DNA byla dále amplifikována, pomocí *HindIII* byly odstraněny adaptory a výsledné fragmenty byly ligovány do *HindIII* místa pUC19. Inzerty klonů obsahující mikrosatelitové repetice byly sekvenovány za použití ABI 377. Testování polymorfismu 11 mikrosatelitových lokusů bylo provedeno celkem na 84 jedincích buřňáka světlého pocházejících ze tří různých kolonií a 6 jedinců bez známého původu. Všechny lokusy vykazovaly polymorfismus, bylo detekováno 3 až 13 alel na lokus.

Moodley *et al.* (2015) navrhli set 25 mikrosatelitových markerů pro buřňáka útlozobého a dále prováděli rozsáhlou *cross-species* studii těchto mikrosatelitů u dalších druhů ze stejné čeledi a u méně příbuzných druhů z čeledi buřňáčkovití. Genomická DNA byla izolována pomocí DNeasy Tissue kit (QIAGEN) z krve nebo svalové tkáně dospělých ptáků – ze 77 jedinců buřňáka útlozobého, 79 jedinců buřňáka holubího (*P. desolata*), 118 jedinců buřňáka širokozobého (*P. vittata*), 18 jedinců buřňáka Salvinova (*P. salvini*), 35 jedinců buřňáka hrdliččího (*P. turtur*), 99 jedinců buřňáka modravého a 6 jedinců buřňáčka Wilsonova (*Oceanites oceanicus*). Sekvence obsahující mikrosatelity byly izolovány ze dvou jedinců buřňáka útlozobého. Genomická DNA byla štípána na fragmenty o velikosti 300–800 bp, které byly ligovány do ssDNA knihovny. Tyto fragmenty byly obohaceny o tandemové repetice a mikrosatelitové lokusy byly izolovány za použití streptavidinem potažených kuliček a biotinem značených oligonukleotidů. Celkem 517 sekvencí obsahovalo vhodné mikrosatelitové repetice, avšak pro navržení primerů bylo použito pouze 166 z nich. Testováno bylo 36 párů

primerů u zdrojového druhu a na *cross-species* PCR amplifikaci u 4 buňáků útlozobých a u 3 buňáků holubích. U zdrojového druhu vykazovalo polymorfismus 25 lokusů. Další testování probíhalo na 77 jedincích buňáka útlozobého z různých populací za účelem určení spolehlivosti amplifikace a genotypů, počet alel se pohyboval v rozmezí od 5 do 48 na lokus. *Cross-species* PCR amplifikace byla prováděna u 5 výše jmenovaných druhů, amplifikace u těchto druhů byla úspěšná a všechny lokusy vykazovaly polymorfismus (kromě Pacbel_03731 u buňáka hrdliččího, který byl monomorfní) s výjimkou buňáčka Wilsonova z čeledi buňáčkovití, kde bylo polymorfních pouze 15 lokusů z 26 testovaných. Počet alel u těchto druhů se pohyboval od 2 do 51. Bylo zjištěno, že jeden z lokusů (Pacbel_00829) je ve vazbě s lokusem Pacbel_03731 a s lokusem Pacbel_08509, zatímco poslední dva jmenované spolu vazbu nevykazovaly, a proto byl Pacbel_00829 vyřazen z analýz.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro analýzu byla použita genomická DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) chovaných v ZOO Dvůr Králové. Izolaci DNA provedl vedoucí bakalářské práce z krve fenol-chloroformovou metodou. Výsledná koncentrace izolované DNA se pohybovala od 20 do 50 µg/ml.

4.2 Amplifikované mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového

Pro *cross-species* PCR amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového s cílem detekovat polymorfni mikrosatelitové lokusy jsem použila celkem 213 párů primerů, ze kterých bylo 207 původně navržených pro ptáky z řádu trubkonosí, (tabulka č. 1) a 5 pro ptáky z řádu dlouhokřídlí a 1 pro ptáky z řádu pěvci (tabulka č. 2).

Tabulka č. 1: Přehled amplifikovaných mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového původně navržených pro druhy z řádu trubkonosí.

Čeď	Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literární zdroj
Albatrosovití (Diomedidae)	Albatros stěhovavý (<i>Diomedea exulans</i>)	7D8, 12C8, 11H7, 10C5, 11H1, 6A3, 12H8, 11F3, 6F12, 12E1	Dubois <i>et al.</i> , 2005
		De1, De2, De3, De7, De11, De12, De17, De18, De25, De30, De33	Burg, 1999
	Albatros šedohlavý (<i>D. chrysostoma</i>)	Dc5, Dc9, Dc10, Dc16, Dc19, Dc20, Dc21, Dc22, Dc26, Dc27, Dc31	
	Albatros šedohlavý, albatros stěhovavý	D6, D24, D29, D32	
	Albatros černobrvý (<i>Thalassarche melanophris</i>), albatros šedohlavý	De35	Burg <i>et</i> Croxall, 2001
	Albatros Gibsonův (<i>Diomedea gibsoni</i>), albatros jižní (<i>D. antipodensis</i>), albatros stěhovavý	De37	Burg <i>et</i> Croxall, 2004
	Albatros bělohřbetý (<i>Phoebastria albatrus</i>)	STAL4, STAL8, STAL12, STAL18, STAL20, STAL 24	Hernandez <i>et al.</i> , 2014

Tabulka č. 1: Pokračování 1.

Čeleď	Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literární zdroj
Albatrosovití (Diomedidae)	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	
Buřňáčkovití (Hydrobatidae)	Buřňáček madeirský (<i>Oceanodroma castro</i>)	Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B,	Sun <i>et al.</i> , 2009
	Buřňáček dlouhokřídlý (<i>O. leucorhoa</i>)	O110-39	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
		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	
	Buřňáček Monteirův (<i>O. monteiroi</i>)	Omn1, Omn2, Omn3, Omn4, Omn6, Omn7, Omn8, Omn11, Omn14, Omn15, Omn16, Omn17, Omn21, Omn22, Omn23, Omn24, Omn25, Omn28	Bried <i>et al.</i> , 2012
Buřňákovití (Procellariidae)	Buřňák bělobradý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	Paequ2, Paequ3, Paequ4, Paequ7, Paequ8, Paequ10, Paequ13	Techow <i>et O'Ryan</i> , 2004
	Buřňák šedý (<i>Calonectris diomedea</i>)	Cd1, Cd2, Cd3, Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd10, Cd11	Bried <i>et al.</i> , 2008
	Buřňák taiko (<i>Pterodroma magentae</i>)	Tch6, Tch25	Lawrence, 2008
	Buřňák trinidadský (<i>Pterodroma arminjoniana</i>)	Parm01, Parm02, Parm03, Parm04, Parm05, Parm06	Brown <i>et Jordan</i> , 2009
	Buřňák 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
	Buřňák Bulwerův (<i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb2, Bb3, Bb7, Bb10, Bb11, Bb12, Bb20, Bb21, Bb22, Bb23, Bb25	Andris <i>et al.</i> , 2010

Tabulka č. 1: Pokračování 2.

Čeleď	Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literární zdroj
Buřňákovití (Procellariidae)	Buřňák havajský (<i>P. sandwichensis</i>)	Ptero01, Ptero02, Ptero03, Ptero04, Ptero05, Ptero06, Ptero07, Ptero08, Ptero09, Ptero10	Welch <i>et al.</i> , 2011
	Buřňák světlonohý (<i>Puffinus carneipes</i>)	Pc A105, Pc A107, Pc A115, Pc B11, Pc B109, Pc B115, Pc C104, Pc D3, Pc D103, Pc D109, Pc D121	Hardesty <i>et al.</i> , 2013
	Buřňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	Patbel1, Patbel2, Patbel3, Patbel4, Patbel5, Patbel6, Patbel7	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

Jelikož autorům uvedených publikací se u zástupců z řádu trubkonosí podařilo amplifikovat polymorfní produkty pomocí 6 párů primerů, které byly původně navrženy pro dva další řády ptáků, konkrétně dlouhokřídlé a pěvce, testovala jsem tyto primery i u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Přehled mikrosatelitových lokusů amplifikovaných pomocí těchto párů primerů uvádím v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Přehled amplifikovaných mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového původně navržených pro druhy z řádu dlouhokřídlí a pěvci, které byly polymorfnní u trubkonosých.

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

4.3 PCR amplifikace DNA

PCR amplifikaci jsem prováděla na DNA šesti nepříbuzných jedinců plameňáka růžového vždy s jedním párem primerů. Složení PCR reakční směsi, kterou jsem připravovala do 1,5ml mikrozkušavek, je uvedeno v tabulce č. 3. PCR reakční směs jsem vždy zvortexovala a krátce zcentrifugovala.

Tabulka č. 3: Složení PCR reakční směsi pro šest vzorků (včetně počítaných ztrát při pipetování).

Složka	Pipetovaný objem (μl)
Deionizovaná voda	44,4
Reaction Buffer A	6,7
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7
Primer R (10 μmol/l)	3,3
Primer F (10 μmol/l)	3,3
aTaq DNA polymeráza (5U/μl)	1,0

Genomickou DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového jsem pipetovala po 1 µl do 0,2ml PCR mikrozkušavek a přidala jsem 9 µl PCR reakční směsi ke každému vzorku. Každá reakce se tedy skládala z 1 µl DNA a 9 µl PCR reakční směsi. PCR mikrozkušavky jsem vložila do termocykléru, kde proběhla PCR reakce, jejíž časový a teplotní profil byl následující:

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

Nejprve jsem testovala všechny uvedené mikrosatelitové lokusy při základní teplotě annealingu 50 °C. V případě, že PCR reakce neposkytla žádný produkt nebo byl produkt po vizualizaci slabě viditelný, snižovala jsem teplotu annealingu až na 46 °C. Naopak pokud byl produkt příliš tmavý nebo slitý do skvrny, teplotu annealingu jsem zvyšovala až na 69 °C, abych získala hodnotitelný výsledek. Vyloučila jsem všechny monomorfní mikrosatelity. Polymorfní mikrosatelity jsem dále zpracovávala za účelem určení optimálních podmínek PCR amplifikace a elektroforetické separace, počtu alel a získání genotypů jednotlivých jedinců.

4.4 Elektroforetická separace PCR produktů

Tento postup je optimalizován pro použití sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

Příprava gelu

1. Obě skla důkladně omýt vodou se saponátem a vydrhnout kartáčkem. Poté opláchnout deionizovanou vodou, osušit, dvakrát opláchnout 96% ethanolem a vysušit papírovým ručníkem.
2. Velké sklo ošetřit na ploše, která se bude dotýkat gelu, přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů (Rain-off). Tento přípravek rozetřít papírovým ubrouskem a po zaschnutí (asi 5 minut), opláchnout deionizovanou vodou a osušit papírovým ručníkem.

3. Malé sklo ošetřit na ploše, která se bude dotýkat gelu, 1 ml roztoku 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Ten rozetřít papírovým ručníkem a po zaschnutí (asi 5 minut) omýt čtyřikrát ethanolem a vždy osušit papírovým ručníkem.
4. Velké sklo umístit ošetřenou plochou nahoru na rovnou polystyrenovou podložku do digestoře, po stranách skla položit 0,4 mm silné spacery a na ně položit ošetřenou plochou malé sklo. Spacery posunout až na okraje skel a gumu spaceru přiložit těsně k menšímu sklu. V místě, kde jsou umístěny spacery, sepnout skla na každé straně dvěma klipsy. Hrany skel jsou na jedné kratší straně v zákrytu, na protilehlé straně jsou posunuty asi o 3 cm.
5. V kádince připravit 6% polyakrylamidový gel, promíchat a pomalu vlít mezi skla po celé délce kratšího skla tam, kde jsou hrany skel posunuty. Poklepávat rukou na skla, aby nedošlo ke vzniku bublin.
6. Po vyplnění celého prostoru mezi skly gelem zasunout v místě, kde se gel naléval, hřebínek jeho rovnou stranou asi 0,7 až 1 cm hluboko. V místě hřebínku sepnout skla čtyřmi klipsy. Gel nechat nejméně hodinu polymerizovat.
7. Po utuhnutí gelu odstranit všechny klipsy a důkladně omýt vodou a kartáčem zejména v oblasti hřebínku. Sklo osušit papírovými ručníky.

Elektroforetická separace

8. Sklo pevně uchytit do elektroforetické komůrky pomocí šroubovacích úchytů hranou s hřebínkem nahoru a malým sklem směrem k hliníkové desce elektroforetické komůrky.
9. Katodový a anodový prostor zalít 0,5 x TBE pufrem, vytáhnout hřebínek a vzniklý prostor mezi skly vyčistit proudem z injekční stříkačky. Katodový i anodový prostor uzavřít, nasadit elektrody a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastavit jako limitní faktor hodnotu výkonu 90 W (hodnotu elektrického napětí nastavit na 3000 V a proudu na 150 mA). Za těchto podmínek gel předehtřívát 30 minut.
10. Vzorky, připravené smísením PCR produktů s 5 μ l nanášecího pufru, vložit před nanášením na 3 minuty do denaturačních podmínek (termocyklér). Po vytažení mikroskopu okamžitě vložit do ledové tříště, aby nedošlo k renaturaci denaturovaných vláken DNA.
11. Během denaturace vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit katodu, otevřít katodový prostor a znovu dobře vymýt proudem pufru z injekční

stříkačky mezeru pro hřebínek. Do této mezery vsunout hřebínek zoubky asi 1 mm do gelu.

12. Nanést 2 µl jednotlivých vzorků 8kanálovou pipetou do mezer mezi zoubky hřebínku. Na všechny vzorky použít stejné špičky, mezi nanášením vzorků pročistit několikrát špičky nasátím a vypuštěním pufru z katodového prostoru. Po nanesení všech vzorků uzavřít katodový prostor, nasadit elektrodu a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jako limitní faktor nastavit hodnotu výkonu 70 W (hodnotu elektrického napětí nastavit na 3000 V a proudu na 150 mA).
13. Doba elektroforetické separace závisí na relativních molekulových hmotnostech (délkách) rozdělovaných PCR produktů, obvykle nechat probíhat 1,5 až 3 hodiny.
14. Během průběhu elektroforetické separace připravit fix/stop roztok, roztok 1% kyseliny dusičné, roztok 0,1% roztoku AgNO_3 a vývojku, kterou je nutno umístit do chladničky, aby byla vychlazená na teplotu nižší než 10 °C.

Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci

15. Po uplynutí doby elektroforetické separace vzorků vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit obě elektrody a šroubem na pravé straně elektroforetické komůrky otevřít kanálek, kterým pufr odtéká z katodového prostoru do sběrného prostoru. Povolit šrouby úchytů skel, skla s gelem vyjmout a položit na vodorovnou podložku menším sklem nahoru. Z prostoru mezi skly vytáhnout spacers, hřebínek a skla od sebe odpáčit čepelí nože.
16. Malé sklo s přilepeným gelem vložit do fotomisky gelem nahoru, umístit na třepačku a zalít fix/stop roztokem. Doba působení fix/stop roztoku je přibližně 20 minut.
17. Fix/stop roztok slít zpět do baňky a sklo s gelem promýt 3krát v 1 až 1,5 litru deionizované vody po dvou minutách. Poté na 5 minut umístit sklo s gelem do 1% roztoku kyseliny dusičné na třepačce, vylít roztok do odpadu a následně promýt gel 3 krát v 1 až 1,5 litru deionizované vody po dvou minutách.
18. Sklo s gelem umístit do fotomisky na třepačku a zalít 0,1% roztokem AgNO_3 , do kterého bylo těsně před použitím přidáno 1200 µl formaldehydu. Tento roztok nechat působit 30 minut.
19. Před uplynutím tohoto času nachystat fotomisku s 1–2 litry deionizované vody a druhou fotomisku s 800 ml vychlazeného vývojky. Do vývojky těsně před použitím napipetovat 1200 µl formaldehydu a 160 µl 1 % roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

20. Fotomisku s roztokem AgNO_3 sejmout z třepačky a slít roztok zpět do zásobní lahve. Sklo s gelem umístit na 5 vteřin do fotomisky s deionizovanou vodou, nechat okapat a přemístit do fotomisky s vývojkou. Fotomisku umístit na třepačku a sledovat vývoj hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů.
21. Po dostatečně zřetelném zabarvení proužků (ještě, než začne vystupovat pozadí) zastavit vyvíjení zbarvení přilítím fix/stop roztoku (uchovaný z kroku č. 16). Roztok nechat působit přibližně 2 minuty, dobu působení lze také odhadnout dle unikání bublin CO_2 z roztoku.
22. Sklo s gelem vyjmout a ponořit asi na 2 minuty do deionizované vody. Popsat sklo fixem v místě spacerů, kde není gel. Umístit na 1 hodinu do sušárny nastavené na $60\text{ }^\circ\text{C}$, kde se gel vysuší. Po vysušení sklo s gelem vyhodnotit na negatoskopu.
23. Sklo s již nepotřebným gelem umístit na několik hodin do roztoku NaOH , 1 mol/l. Gel se kompletně odlepi, popřípadě jej odstranit škrabkou. Sklo po umytí lze opakovaně použít.

4.5 Chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/ μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l, 400 μl každého), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol – 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminetetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachner)
- Formaldehyd (AppliChem)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N'-methylenbisakrylamid (AppliChem)

- N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Rain off – tekuté stěrače (Sheran)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.6 Roztoky

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok

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

Hydroxid sodný, 1 mol/l roztok

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

Kyselina dusičná, 1% roztok

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

Peroxodisíran amonný, 10% roztok

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

Fix/Stop roztok

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

Nanášecí roztok pro ELFO

- 0,125 g xylenové modře
- 0,125 g bromfenolové modře

- 25 ml deionizované vody
- 100 ml formamidu

Polyakrylamidový 6% gel

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈
- 40 µl N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu

Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

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

Vývojka

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

Zásobní roztok akrylamidu, 6%

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 50 ml 10 x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N, N' - methylenbisakrylamid 19:1
- po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

Zásobní roztok 10 x TBE pufr

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

4.7 Laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette – 0,5 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)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér TC XP (BIOER)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5 Výsledky

Pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace jsem testovala genomickou DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) za použití celkem 213 párů primerů, které amplifikovaly polymorfní produkt u ptáků z řádů trubkonosí, s cílem určit polymorfní lokusy a jejich genotypy u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Z celkového počtu 213 testovaných mikrosatelitových lokusů bylo 207 původně odvozeno od ptáků z řádu trubkonosí, kdy 53 bylo charakterizováno od druhů z čeledi albatrosovití, 54 od druhů z čeledi buňáčkovití a 100 mikrosatelitových lokusů bylo popsáno u druhů z čeledi buňákovití. Zbývající mikrosatelitové lokusy (6) byly původně popsány u ptáků z řádů dlouhokřídlí a pěvci, tedy 5 lokusů bylo odvozených od dlouhokřídlých, kdy bylo vždy po 1 charakterizováno pro druhy z čeledi alkovití a kulíkovití a 3 pro racka novozélandského z čeledi rackovití; a 1 lokus byl odvozený od lesňáčka žlutohého z čeledi lesňáčkovití z řádů pěvci. Tyto lokusy byly dříve úspěšně použity u trubkonosých, a proto jsem je též zahrnula do testování u plameňáka růžového.

Provedla jsem *cross-species* PCR amplifikaci postupně se všemi výše zmíněnými primery nejprve při annealingové teplotě 50 °C a určovala jsem, zda jsou amplifikované lokusy u plameňáka růžového polymorfní či monomorfní. Pokud PCR reakce neposkytla žádný produkt, snižovala jsem teplotu annealingu až na 46 °C, naopak, byl-li produkt příliš intenzivní a špatně hodnotitelný, zvyšovala jsem teplotu annealingu až na 69 °C. Všechny *cross-species* PCR amplifikace poskytly produkt. Monomorfní mikrosatelity jsem vyloučila a u mikrosatelitů, které jsem určila jako polymorfní, jsem dále optimalizovala podmínky PCR reakce a čas elektroforetické separace, abych mohla genotypovat 6 testovaných nepříbuzných jedinců.

Z celkového počtu 213 mikrosatelitových lokusů, které jsem testovala, bylo u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 164 monomorfních, 48 polymorfních a jeden mikrosatelit jsem určila jako nehodnotitelný, konkrétně šlo o lokus Puff G2C izolovaný od buňáka baleárského z čeledi buňáčkovití, u kterého nebylo možné určit genotyp, dále se jím proto nezabývám. U 48 polymorfních mikrosatelitových lokusů jsem prováděla genotypizaci na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového a pozorovala jsem od 2 do 5 alel. U dvou testovaných lokusů jsem detekovala 2 polymorfní místa po 2 alelách, konkrétně se jednalo o lokus Omn25, který byl izolovaný

od buňňáčka Monteirova, a o lokus Pc D3, tento byl odvozený od buňňáka světlenohého. Polymorfnní lokusy nalezené u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového společně s optimalizovanými podmínkami PCR reakce a elektroforetické separace jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Z mikrosatelitových lokusů polymorfnních u plameňáka růžového, které byly původně navrženy pro ptáky z řádu trubkonosí, bylo nejvíce z nich (26) původně popsáno u druhů z čeledi buňňákovití, 12 mikrosatelitových lokusů bylo původně popsáno u druhů z čeledi buňňáčkovití a nejméně (8) bylo původně popsáno u druhů z čeledi albatrosovití. Zbývající dva polymorfnní mikrosatelitové lokusy pocházely od zástupů řádu dlouhokřídlní, konkrétně RBG29, izolovaný od racka novozélandského z čeledi rackovití, a Calex-01, původně charakterizovaný u kulíka mořského z čeledi kulíkovití.

Z 213 testovaných mikrosatelitových lokusů vykazovalo polymorfismus u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 48 z nich, tudíž úspěšnost nalezení polymorfnního mikrosatelitového lokusu v této práci byla 22,5 %. V rámci řádu trubkonosí vykazovaly největší úspěšnost polymorfismu mikrosatelitové lokusy z čeledi buňňákovití, kde z celkového počtu 100 testovaných lokusů bylo 26 polymorfnních, úspěšnost tedy byla 26 %. Z čeledi buňňáčkovití bylo testováno 54 mikrosatelitových lokusů a polymorfismus vykazovalo 12 z nich, úspěšnost byla 22,2 %. Nejmenší úspěšnost nalezení polymorfnního lokusu, 15,1 %, jsem detekovala u lokusů navržených pro druhy z čeledi albatrosovití, kde bylo polymorfnních 8 z 53 testovaných lokusů. V rámci řádu dlouhokřídlní jsem testovala celkem 5 mikrosatelitových lokusů, odvozených od druhů ze tří čeledí (alkovití, kulíkovití, rackovití), 2 z nich vykazovaly polymorfismus. Z řádu pěvců jsem testovala pouze 1 mikrosatelitový lokus izolovaný z čeledi lesňáčkovití, ten však polymorfismus nevykazoval. Podrobné rozdělení polymorfnních mikrosatelitových lokusů dle čeledí i druhů, od kterých byly izolovány, je uvedeno v následujícím grafu č. 1.

Tabulka č. 4: Charakteristika 48 (respektive 50) polymorfních mikrosatelitových lokusů nalezených u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. V tabulce je uveden název lokusu s GenBank Accession number, zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel (A), annealingová teplota (T_a) a čas elektroforetické separace (ELFO).

Název lokusu (Accession no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	A	T_a [°C]	ELFO [min]
12H8 (AY945756)	Albatros stěhovavý	F: CATGCCTGAATGCACTTTGT R: CACAATGGGTATAAGATTTTGCTG	GT/AT	2	63	90
De25 (AF096805)		F: CATGATGTCAAGGGCTCCTC R: AGCCCCTTGATGTGATTTT	A/GA	2	51	90
Dc5 (AF096790)	Albatros šedohlavý	F: AGGAGGGAACTTCTCCAG R: AGCAGGGAGTGACTTGAGGA	AC/CAC	3	63	90
Dc31 (AF096810)		F: CTGACTCTCTGGGATGAGCC R: GTACCCCTGGAAAGCCAGAC	CA/GC/AN/AG	2	64	90
D29 (AF096808)	Albatros šedohlavý a stěhovavý	F: TTTGGGGATAGATGGGTCAC R: GTTTTTCCCTTCTGTGCTGG	CT/GACACA	4	55	90
LAAL7 (neuvedeno)	Albatros laysanský	F: CAGCATGACCAAATCCATCC R: GTTTGGACACAAATGCCGTTCTTG	AGC	3	63	90
LAAL10 (neuvedeno)		F: TCCCAGCAGTGAAGCCATAG R: GTTTGGCAGGTAAGGAGAACAGAGG	AGT	4	62	90
LAA19 (neuvedeno)		F: ATGACCAGTGCCATCAACAG R: TGGCCAGATGTGATTTGAAG	ATCC	4	57	90
Oc28B (FJ238097)	Buřňáček madeirský	F: GCGTTGACCAGCAAATAGTC R: GGAAGGCTACCACAATTTCA	TG	3	56	90
Oc49 (FJ238098)		F: TGCTTCTGGATTTGTTTTGC R: CAAACCGTGTGACCCAGATA	CA	5	62	150
Oc63 (FJ238100)		F: TCACACCAACCTCCATGAAA R: AACGGGGAATATGTGGTTCTT	GA	2	57	90

Tabulka č. 4: Pokračování 1.

Název lokusu (Accession no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	A	T _a [°C]	ELFO [min]
O110-39 (FJ238106)	Buřňáček dlouhokřídlý	F: TTAAGAACAGAGCCTGACTTG R: ACAAATCTCATGTCCTTGG	GT	3	58	90
Ole02 (FR696378)		F: GGGTTCCTGTTACCAAAGGGCAG R: CATAAGCACAAGGTTCTAGCTCCCTC	GAAA	5	62	180
Ole09 (FR696385)		F: GGCCTGGATTCTGCGTGTTGGG R: CAGCTACAGGCCACGGGTGC	CA	5	69	90
Ole17 (FR696393)		F: TGACATGACCACTTCCATAGC R: AATGTCTGTGGTTCAAATGTGC	GT/GG	2	57	90
Ole21 (FR696397)		F: CCACGAGAAATGGACATACAAC R: TGAAGAACTTCCGAAATAACTGTG	GA/A/GAAA	2	55	90
Omn1 (JQ303226)	Buřňáček Monteirův	F: TTTTGTGTTTTGATTCTCACATTCTT R: TGGGAGTGACCTGCTTACCT	AC/TG	3	58	90
Omn8 (JQ303232)		F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTA	AC	5	59	90
Omn21 (JQ303238)		F: TTTTGTGTTTTGATTCTCACATTCTT R: TAACCCAGAAAAATGCAGCC	GTT	2	54	90
Omn25 (JQ303242)		F: TCTGCTCCCCCTGATTATTG R: ACTCTGAGAGCCATCCATCA	ATGG	2+2	46	90
Paequ3 (AY371071)	Buřňák bělobradý	F: TGTGGGTGCAGTAGAGCA R: CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	GA	4	65	180
Cd5 (EU029087)	Buřňák šedý	F: CTGCACAGACTGAGAGTATAAGATTC R: GGCTTAAAGGGTAAATACACATGG	GT/AT	2	55	90
Tch6 (neuveveno)	Buřňák taiko	F: GTTTCTTGGTGGTGGCTGAAGGTGTATG R: GCCATTTGAGAATGTTTCAGC	GT/GC	3	55	90

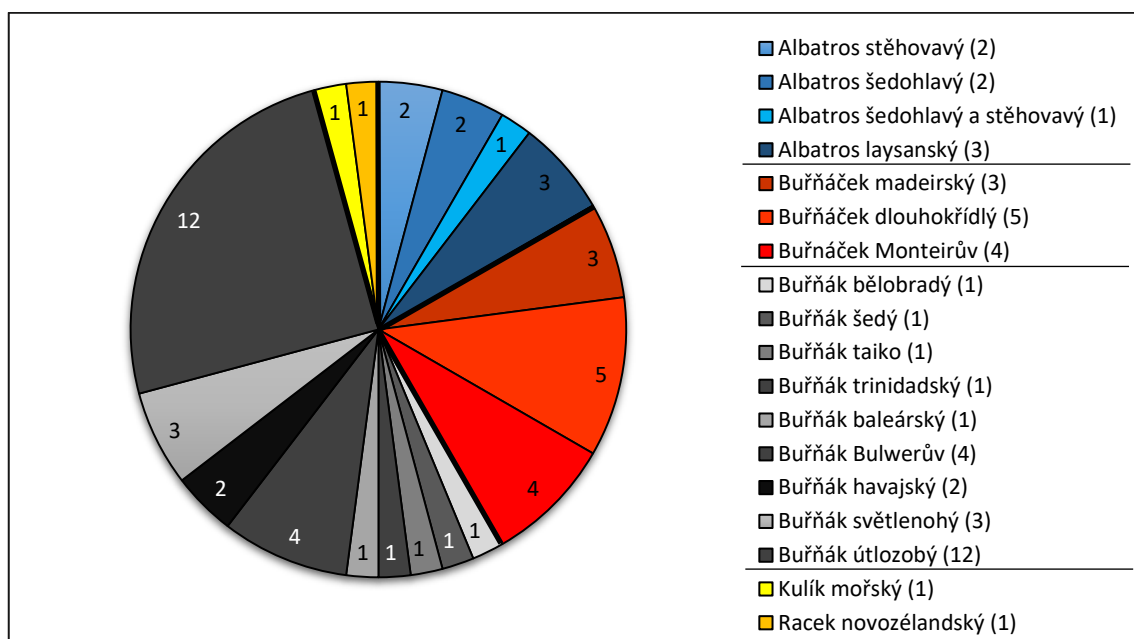
Tabulka č. 4: Pokračování 2.

Název lokusu (Accession no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	A	T _a [°C]	ELFO [min]
Parm01 (EU360817)	Buňák trinidadský	F: CTGGACTCAGTGCCCTCTTC R: CAGGGCAGAAGCTCGTCTAT	CA	4	65	180
Puff G2F (EU158899)	Buňák baleárský	F: GCTCTCCCAGTTTGCACG R: TCCCATGCTTTAACCACTG	GT	2	58	120
Bb20 (HM171896)	Buňák Bulwerův	F: TGGTGAACAGCAGACACTTTC R: GAGTGCAGAGCTGGTAGTCG	TG	2	54	90
Bb21 (HM171897)		F: CTGATGTTCCAGGCCCTAAT R: CCTCTGAGCCAGCTAATTCC	TG	2	56	90
Bb22 (HM171898)		F: TTCACAGCAGAATCACCTCAG R: GCTCAAAGGGTGAATTGTT	TG	2	58	90
Bb25 (HM171901)		F: GCATCCCTGGA ACTCTGATT R: GAATGAACCAGCCAGAAGGT	AC	3	56	90
Ptero03 (HQ918220)	Buňák havajský	F: TGTGTACAGCATGTGCTTGAG R: GCTGAATGGCAGTTTCTTCC	CA	2	48	90
Ptero05 (HQ918222)		F: TGCTGTCGGCTGGGTTAC R: CTGCCTGCCTTCCTGAAAC	AAG/AGG	2	62	120
Pc B109 (JX435475)	Buňák světlenohý	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATT CAGGATGTAGGTTC	CAA	2	58	120
Pc D3 (JX435478)		F: CCTCTGCTCAAGTCTGTAC R: AAACCTCCTTTGGGATGA	GATA/GAAA	2+2	48	90
Pc D103 (JX435479)		F: GGAAAGATGT CATGCTGATGA R: GTGGGAGATTCATAGGCAAAG	GATA/GATG	2	58	90
Pacbel_00386 (neuvedeno)	Buňák útlozobý	F: GCATGTCTACAAACAAGCACG R: TCACTGGAAACCAGAGTAGGC	AC	3	55	90
Pacbel_07265 (neuvedeno)		F: CGTCACTTTAATAGCGCTGGC R: ACCCTGATTTTCCCAGTCCG	GT	2	62	90

Tabulka č. 4: Pokračování 3.

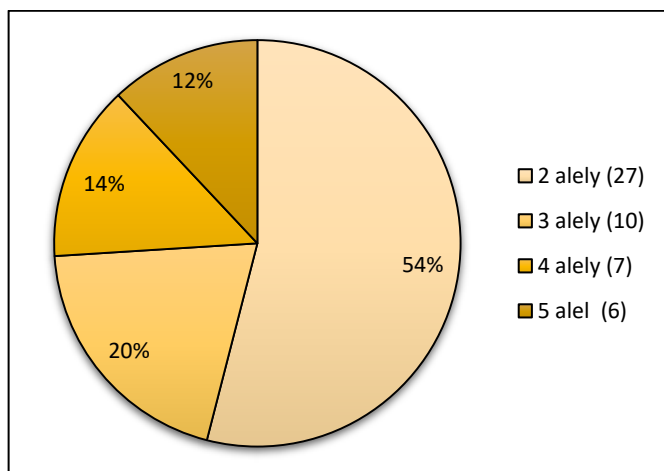
Název lokusu (Accession no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	A	T _a [°C]	ELFO [min]
Pacbel_08867 (neuvedeno)	Buřňák útlozobý	F: TTTGGTCAATTTTCCCTCGC R: ACAGAAAACCAATGTTGTTAATAGG	GA	2	50	90
Pacbel_08988 (neuvedeno)		F: CTGATCGGTTGTGCTCTGTG R: GCGGAAAGATCCTAACAAGCC	CT	3	66	90
Pacbel_09021 (neuvedeno)		F: ATCTGCGCATGCAGTGATAG R: CACAGCTAGCAGCATTGACC	GT	4	59	150
Pacbel_09528 (neuvedeno)		F: AACTGTTTGCTCCACACCAC R: ATGGCTTGGAAGTCTCCCTG	AC	5	59	90
Pacbel_10033 (neuvedeno)		F: CAACGCGCTTTTGGTTTTGC R: GGCCACTCACCACAATACAAG	TG	2	54	90
Pacbel_15327 (neuvedeno)		F: TTCTTGTAGCAGTAGGAGACC R: ACCTCATGTGTAACCTGCC	CA	2	60	90
Pacbel_17944 (neuvedeno)		F: TACAACCGTTCTCCCTGTGG R: GGAGAAGCAGGCAGCAATAC	TG	3	58	120
Pacbel_17986 (neuvedeno)		F: ATAACCCAGTGTGATGGTGC R: CACAGCTGCTTAGTGACACAG	GT	2	62	90
Patbel 3 (JF288777)		F: CCTTCCCTAGAGCAATGGAG R: TGCACACACTGAAAGAGGACA	CTAT	2	55	90
Patbel 7 (JF288781)		F: GAATCTCCCTTGCTGCAGTT R: AGGCCAGTAGGTAGGTAGGTGA	CTAT	4	58	90
Calex-01 (AM072446)	Kulík mořský	F: CTTCTCCATTGTTGTCACCTCCAGT R: CTTGACTTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT/GA/GC	2	68	90
RBG29 (AY091853)	Racek novozélandský	F: CCTAGCTTTTTGGACTCAGT R: GTGGTGTTGCAATAGGATTC	GT	5	60	90

Graf č. 1: Rozdělení 48 párů primerů, které amplifikovaly mikrosatelitové lokusy polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového dle čeledí a druhů, od kterých byly původně odvozeny. Čeledi z řádu trubkonosí jsou barevně odlišeny: albatrosovití (modrá), buňňáčkovití (červená) a buňňákovití (šedá); žlutě jsou vyznačeny polymorfní mikrosatelity izolované od druhů z řádu dlouhokřídlí. V grafu je u každého druhu uveden počet polymorfních mikrosatelitových lokusů od něho izolovaných.



Celkem 48 párů primerů amplifikovalo 50 polymorfních PCR produktů se 2–5 alelami, jelikož 2 páry primerů primerů amplifikovaly 2 polymorfní oblasti. Dvacet pět produktů PCR, tedy 54 %, obsahovalo pouze 2 alely. Deset polymorfních produktů (20 %) obsahovalo 3 alely, 7 polymorfních produktů (14 %) obsahovalo 4 alely a 6 polymorfních produktů (12 %) obsahovalo 5 alel. Obecně v této práci tedy platí, že četnost mikrosatelitových lokusů klesá se zvyšujícím se počtem alel. Grafické rozdělení 50 polymorfních produktů amplifikovaných 48 páry primerů dle počtu alel se zohledněním faktu, že 2 mikrosatelitové lokusy (Omn25 a Pc D3) obsahovaly 2 polymorfní oblasti po 2 alelách, je uvedeno v grafu č. 2.

Graf č. 2: Rozdělení 50 polymorfních produktů amplifikovaných u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 48 páry primerů navržených pro ptáky z řádu trubkonosí a dlouhokřídlí, dle počtu alel. V grafu jsou uvedeny počty polymorfních produktů a jejich četnosti v rámci polymorfních mikrosatelitů u plameňáka růžového. V grafu je zohledněna skutečnost, že 2 mikrosatelitové lokusy obsahovaly 2 polymorfní oblasti po 2 alelách.



V následující tabulce uvádím 50 polymorfních produktů amplifikovaných u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 48 páry primerů. Na lokusu Omn25 izolovaného od buňňáčka Monteirova jsem detekovala 2 polymorfní oblasti, každé z nich mělo 2 alely, stejně tak na lokusu Pc D3 izolovaného od buňňáčka světlého, který obsahoval 2 polymorfní oblasti po 2 alelách. U obou lokusů uvádím tedy dva genotypy.

Tabulka č. 5: Genotypy 50 polymorfních produktů amplifikovaných u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 48 páry primerů. V tabulce je uveden název lokusu, počet alel a genotypy jedinců.

Název lokusu	Počet alel	Genotypy 6 nepříbuzných jedinců
12H8	2	2/2 2/2 2/2 1/2 2/2 2/2
De25	2	1/2 2/2 1/2 2/2 2/2 2/2
Dc31	2	1/2 1/2 1/2 1/2 1/1 1/2
Dc5	3	2/2 2/3 1/3 1/3 3/3 2/3
D29	4	3/4 2/4 4/4 1/4 3/3 4/4
LAAL7	3	2/2 1/2 3/3 2/2 1/2 2/2
LAAL10	4	4/4 1/4 3/3 3/4 2/3 4/4
LAA19	4	1/2 1/3 3/4 2/2 3/4 1/3
Oc28B	3	3/3 1/1 2/2 1/2 1/2 2/2
Oc49	5	2/4 2/5 3/5 3/5 2/3 1/2
Oc63	2	1/2 2/2 1/1 1/1 1/1 1/1

Tabulka č. 5: Pokračování.

Název lokusu	Počet alel	Genotypy 6 nepříbuzných jedinců
O110-39	3	1/3 1/1 1/2 3/3 1/1 1/1
Ole02	5	2/3 1/3 3/5 3/3 4/4 5/5
Ole09	5	3/5 2/5 1/4 4/5 3/4 3/4
Ole17	2	1/1 1/2 1/1 1/1 1/1 1/1
Ole21	2	2/2 1/2 2/2 2/2 2/2 2/2
Omn1	3	2/3 2/2 2/2 2/3 1/3 1/2
Omn8	5	1/5 2/2 2/3 1/4 1/2 1/4
Omn21	2	1/2 1/2 1/1 1/1 1/1 1/2
Omn25	2+2	1/1 1/2 1/2 1/1 1/2 1/2
		2/2 2/2 1/2 2/2 2/2 2/2
Paequ3	4	2/3 1/2 2/2 2/3 2/2 2/3
Cd5	2	1/1 1/1 1/1 1/1 1/1 1/2
Tch6	3	3/3 2/3 1/3 1/2 3/4 1/3
Parm01	4	2/4 2/3 1/3 3/4 2/2 1/3
Puff G2F	2	1/1 2/2 1/2 1/2 1/2 1/1
Bb20	2	2/2 1/2 2/2 1/2 1/2 2/2
Bb21	2	1/1 1/1 1/1 1/1 1/2 1/1
Bb22	2	1/1 1/1 1/1 1/1 1/2 1/2
Bb25	3	1/2 1/2 2/3 2/2 2/2 2/2
Ptero03	2	2/2 2/2 2/2 1/2 2/2 2/2
Ptero05	2	1/1 2/2 1/1 2/2 2/2 2/2
Pc B109	2	2/2 2/2 1/2 2/2 2/2 2/2
Pc D3	2+2	1/1 2/2 1/2 1/1 1/1 1/2
		1/2 1/2 1/2 2/2 2/2 2/2
Pc D103	2	2/2 1/2 2/2 1/2 2/2 2/2
Pacbel_00386	3	1/3 2/2 2/3 2/2 2/2 2/2
Pacbel_07265	2	1/1 1/1 1/1 1/1 2/2 2/2
Pacbel_08867	2	1/1 1/1 1/1 1/1 1/2 1/1
Pacbel_08988	3	1/2 1/2 1/1 1/2 1/3 1/2
Pacbel_09021	4	2/3 1/3 2/3 2/3 1/3 1/4
Pacbel_09528	5	3/5 1/3 3/4 3/4 3/5 2/3
Pacbel_10033	2	2/2 2/2 1/2 1/2 2/2 2/2
Pacbel_15327	2	2/2 1/2 2/2 2/2 2/2 2/2
Pacbel_17944	3	1/3 2/2 2/2 2/2 1/1 3/3
Pacbel_17986	2	1/2 1/1 2/2 2/2 2/2 2/2
Patbel3	2	1/1 1/1 1/1 1/2 1/1 1/1
Patbel7	4	1/3 1/4 1/4 1/3 1/2 1/3
Calex-01	2	1/1 1/2 1/1 1/1 1/1 1/1
RBG29	5	3/3 3/5 1/5 4/5 2/3 2/5

Na následujících fotografiích jsou zobrazeny elektroforetogramy vybraných mikrosatelitových lokusů po *cross-species* PCR amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců

plameňáka růžového. Konkrétně se jedná o lokus Pc D3, který obsahoval 2 polymorfni místa po 2 alelách, a lokus De25, u kterého byly detekovány 2 alely.

Obrázek č. 2: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Pc D3, u kterého byly detekovány u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 2 polymorfni oblasti po 2 alelách. Polymorfni oblasti a alely jsou vyznačeny v obrázku.



Obrázek č. 3: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu De25, u kterého byly detekovány u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 2 alely, které jsou vyznačeny v obrázku.



6 Diskuze

V této bakalářské práci jsem testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace celkem 213 mikrosatelitových lokusů, které byly polymorfni u ptáků z řádu trubkonosí, na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového, přičemž 207 mikrosatelitových lokusů bylo původně navrženo pro druhy z řádu trubkonosí a 6 mikrosatelitových lokusů pro druhy z řádu dlouhokřídli a pěvci. Z celkového počtu 213 mikrosatelitů bylo u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového polymorfni 49 mikrosatelitových lokusů, přičemž 48 z nich poskytovalo hodnotitelný produkt. Dále u 2 mikrosatelitových lokusů jsem detekovala 2 polymorfni oblasti vždy po 2 alelách.

Z čeledi albatrosovití bylo prozatím popsáno 53 polymorfni mikrosatelitových lokusů celkem od 8 druhů. U 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, kteří byli na tyto mikrosatelity testováni, bylo polymorfni 8 z nich, konkrétně 2 mikrosatelitové lokusy odvozené od albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*) a 2 mikrosatelitové lokusy od albatrosa šedohlavého (*D. chrysostoma*) a 1 mikrosatelitový lokus byl navržen pro oba zmíněné druhy. Zbývající 3 mikrosatelitové lokusy byly odvozeny od albatrosa laysanského (*Phoebastria immutabilis*).

Burg (1999) publikovala 26 mikrosatelitových lokusů od albatrosa stěhovavého a albatrosa šedohlavého. Všechny mikrosatelitové lokusy byly amplifikovány za použití 2 různých teplot annealingu (T_a), kdy prvních 7 cyklů probíhalo za T_{a1} a dalších 25 cyklů probíhalo za T_{a2} . Variabilita byla testována na 90 jedincích albatrosa stěhovavého, na 50 jedincích albatrosa šedohlavého a na 50 jedincích albatrosa černobrvého (*Diomedea melanophris*). U 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového vykazovaly 4 z těchto mikrosatelitových lokusů polymorfismus. Lokus Dc5 odvozený od albatrosa šedohlavého byl u zdrojového druhu polymorfni se 4 alelami při T_{a1} 46 °C a T_{a2} 48 °C a u albatrosa černobrvého s 5 alelami, u plameňáka růžového jsem při *cross-species* PCR amplifikaci detekovala 3 alely při T_a 63 °C. Dc25 navržený pro albatrosa stěhovavého testovala Burg (1999) při T_{a1} 48 °C a T_{a2} 52 °C a u zdrojového druhu nedetekovala polymorfismus, zatímco u albatrosa černobrvého byl lokus polymorfni se 4 alelami; u plameňáka růžového jsem jej určila jako polymorfni se 2 alelami při T_a 51 °C. Lokus Dc31 byl též u albatrosa šedohlavého při T_{a1} 48 °C a T_{a2} 52 °C monomorfni, avšak u plameňáka růžového jsem detekovala 2 alely při T_a 64 °C. Lokus D29 vykazoval polymorfismus

pouze u albatrosa šedohlavého, kde Burg (1999) našla 2 alely při T_{a1} 48 °C a T_{a2} 52 °C. U plameňáka růžového jsem detekovala 4 alely při T_a 55 °C. Lokusy D29 i Dc31 určila autorka u albatrosa černobrvého jako monomorfní.

Dubois *et al.* (2005) popsali 10 variabilních dinukleotidových mikrosatelitů u albatrosa stěhovavého. U 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového jsem určila jako polymorfní pouze 1 z nich, a to lokus 12H8, u kterého jsem detekovala 2 alely při T_a 63 °C, zatím u 60 testovaných jedinců zdrojového druhu autoři našli 5 alel při T_a 58 °C.

Hernandez *et al.* (2014) navrhli 15 polymorfních mikrosatelitových markerů pro albatrosa černonohého (*Phoebastria nigripes*), laysanského a bělohřbetého (*P. albatrus*). U 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového jsem určila jako polymorfní 3 mikrosatelitové lokusy odvozené od albatrosa laysanského, jejichž variabilitu testovali na 12 jedincích tohoto druhu. Pro analýzy autoři využili u všech mikrosatelitových lokusů stejnou T_a 60 °C. U mikrosatelitu LAAL7 jsem detekovala u plameňáka růžového 3 alely při T_a 63 °C, přičemž Hernandez *et al.* (2014) u albatrosa laysanského našli alely 4. Mikrosatelit LAAL10 jsem určila jako polymorfní při T_a 62 °C u plameňáka růžového se 4 alelami, zatímco u albatrosa laysanského vykazoval alel 10. U posledního ze tří lokusů, LAAL19, jsem detekovala u plameňáka růžového 4 alely za použití T_a 57 °C, zatímco u albatrosa laysanského našli autoři 6 alel.

Z čeledi buřňáčkovití bylo popsáno 54 polymorfních mikrosatelitových lokusů celkem od 3 druhů. U 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, kteří byli na tyto mikrosatelity testovány, bylo polymorfních 12 z nich, přičemž 3 mikrosatelitové lokusy byly odvozeny od buřňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*), 5 mikrosatelitových lokusů bylo odvozeno od buřňáčka dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*) a 4 mikrosatelitové lokusy od buřňáčka Monteirova (*O. monteiroi*).

Pro 10 mikrosatelitových lokusů Sun *et al.* (2009) navrhli primery pro buřňáčka madeirského a buřňáčka dlouhokřídlého. Z těchto mikrosatelitových lokusů byly celkem 4 polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Při amplifikaci všech lokusů autoři použili stejnou teplotu annealingu – 50 °C. Variabilitu testovali u 27 jedinců buřňáčka madeirského, 22 jedinců buřňáčka Monteirova a 24 jedinců buřňáčka dlouhokřídlého. Oc28B byl u plameňáka růžového polymorfní se 3 alelami při T_a 56 °C,

příčemž u buňňáčka madeirského a Monteirova byly detekovány také 3 alely a u buňňáčka dlouhokřídlého byl tento lokus určen jako monomorfní. U plameňáka růžového jsem detekovala 5 alel u lokusu Oc49 při T_a 62 °C, zatímco autoři pozorovali po 3 alelách u buňňáčka Monteirova a dlouhokřídlého a u buňňáčka madeirského mikrosatelit určili jako monomorfní. Jako polymorfní se 2 alelami jsem určila Oc63 za použití T_a 57 °C u plameňáku růžového, Sun *et al.* (2009) u tohoto lokusu detekovali po 4 alelách u buňňáčka madeirského a dlouhokřídlého. U lokusu O110-39, který byl jako jediný izolovaný od buňňáčka dlouhokřídlého, jsem u plameňáka růžového pozorovala 3 alely za použití T_a 58 °C, autoři u O110-39 detekovali u buňňáčka dlouhokřídlého také 3 alely a u buňňáčka madeirského a Monteirova po 8 alelách.

Bicknell *et al.* (2011) popsali 26 variabilních mikrosatelitových lokusů u 24 jedinců buňňáčka dlouhokřídlého, ze kterých byly 4 polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. U lokusů Ole02 a Ole09 jsem našla u plameňáka růžového po 5 alelách při T_a 62 °C a T_a 69 °C, což byla nejvyšší T_a v rámci této práce. Autoři u buňňáčka dlouhokřídlého u Ole02 detekovali 12 alel a u Ole09 2 alely za použití T_a 60 °C. Ole17 vykazoval u plameňáka růžového polymorfismus se 2 alelami při T_a 57 °C, zatímco u zdrojového druhu byl počet alel za použití T_a 60 °C 5. U plameňáka růžového jsem detekovala též 2 alely u lokusu Ole21 avšak při T_a 55°C, u buňňáčka dlouhokřídlého autoři pozorovali 21 alel opět při T_a 60 °C.

Bried *et al.* (2012) popsali 18 variabilních mikrosatelitů u buňňáčka Monteirova. U 6 testovaných nepříbuzných jedinců plameňáka růžového vykazovaly polymorfismus 4 z nich. Autoři testovali všechny mikrosatelitové lokusy na 125 nepříbuzných jedincích vždy s použitím T_a 58 °C. U lokusu Omn1 jsem detekovala u plameňáka růžového 3 alely při T_a 58 °C, Bried *et al.* (2012) detekovali u buňňáčka Monteirova alel 8. U lokusu Omn8 jsem detekovala 5 alel při T_a 59 °C, zatímco autoři pozorovali u zdrojového druhu alel 10. Dvě alely jsem detekovala u lokusu Omn21 při T_a 54 °C. U lokusu Omn25 jsem při T_a 46 °C, což byla nejnižší teplota annealingu, kterou jsem v rámci této práce použila, detekovala 2 polymorfní oblasti po 2 alelách. Autoři u buňňáčka Monteirova detekovali u Omn21 6 alel a u Omn25 5 alel.

Z čeledi buňňákovití bylo prozatím izolováno 100 polymorfních mikrosatelitových lokusů celkem od 9 druhů. U 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, kteří byli

na tyto mikrosatelity testováni, bylo polymorfních 26 z nich, konkrétně po 1 mikrosatelitovém lokusu odvozeném od buňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), šedého (*Calonectris diomedea*), taiko (*Pterodroma magentae*), trinidadského (*P. arminjoniana*) a baleárského (*Puffinus mauretanicus*), 2 mikrosatelitové lokusy původně navržené pro buňáka havajského (*P. sandwichensis*), 4 mikrosatelitové lokusy pro buňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), 3 mikrosatelitové lokusy pro buňáka světlenohého (*P. carneipes*) a nejvíce polymorfních mikrosatelitů (12) u plameňáka růžového bylo odvozeno od buňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*).

Šest polymorfních dinukleotidových mikrosatelitových lokusů izolovali Techow *et O’Ryan* (2004) od buňáka bělobradého. U 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového byl polymorfní mikrosatelitový lokus Paequ3, u kterého jsem detekovala 4 alely při T_a 65 °C, zatímco autoři u 93 jedinců buňáka bělobradého pozorovali 9 alel při T_a 55 °C. Paequ3 testovali autoři pomocí *cross-species* PCR amplifikace na dalších 6 druzích: buňákovi tristanském, obrovském, Hallově a také na druzích z čeledi albatrosovití – albatrosovi stěhovaném, šedohlavém a černobrvém. Mikrosatelit byl polymorfní u všech těchto druhů, kromě albatrosa stěhovavého, kde se neamplifikoval; počet alel autoři neuvádějí.

Bried *et al.* (2007) popsali 11 variabilních dinukleotidových mikrosatelitů u buňáka šedého, z nichž 1 vykazoval polymorfismus u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, konkrétně šlo o lokus Cd5, u kterého jsem detekovala 2 alely při T_a 55 °C. Autoři u buňáka šedého detekovali u 43 jedinců buňáka šedého 6 alel při T_a 58 °C.

Lawrence (2008) popsala dva nové mikrosatelitové markery u buňáka taiko (*P. magentae*), ze kterých se u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového amplifikoval 1 polymorfní lokus Tch6, kde jsem detekovala 3 alely při T_a 55 °C. Autorka testovala tento lokus na 143 jedincích buňáka taiko a našla u něj 2 alely při T_a 57 °C.

Gonzales *et al.* (2008) izolovali 10 nových polymorfních mikrosatelitových lokusů od buňáka baleárského, z nichž jsem u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového určila jako polymorfní pouze lokus Puff G2F, u kterého se amplifikovaly při T_a 58 °C 2 alely, stejně jako u 51 jedinců buňáka baleárského, kde však autoři použili T_a 60 °C. Gonzales *et al.* (2008) dále testovali Puff G2F pomocí *cross-species* PCR amplifikace na 23 jedincích buňáka středomořského, kde jej však určili jako monomorfní.

Od buřňáka trinidadského Brown *et* Jordan (2009) izolovali 6 mikrosatelitových lokusů. U 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového jsem jako polymorfní určila pouze lokus Parm01, u kterého jsem po amplifikaci našla 4 alely při T_a 65 °C, zatímco u zdrojového druhu autoři detekovali u 340 jedinců alel 10 za použití T_a 55 °C. Parm01 byl dále testován pomocí *cross-species* PCR amplifikace na dalších 17 druzích z řádu trubkonosí a 1 druhu z řádu tučňáci (tučňák žlutorohý), přičemž vykazoval polymorfismus u 12 testovaných druhů z řádu trubkonosí s počtem alel od 2 do 9; u tučňáka žlutorohého byl též polymorfní se 7 alelami. Počet testovaných jedinců se u těchto 13 druhů pohyboval 5–17, viz tabulka č. 6.

Tabulka č. 6: Polymorfismus lokusu Parm01 odvozeného od buřňáka trinidadského, u 12 druhů z řádu trubkonosí a u tučňáka žlutorohého, které Brown *et* Jordan (2009) testovali na *cross-species* PCR amplifikaci. Ve sloupcích je uveden název druhu, počet testovaných jedinců (N) a počet alel (A) amplifikovaných u lokusu Parm01.

Druh	N	A
Buřňák trinidadský (<i>Pterodroma arminjoniana</i>)	340	10
Buřňák proměnlivý (<i>P. neglecta</i>)	17	9
Buřňák madeirský (<i>P. madeira</i>)	8	4
Buřňák kapverdský (<i>P. feae</i>)	8	3
Buřňák bermudský (<i>P. cahow</i>)	5	3
Buřňák Bulwerův (<i>Bulweria bulwerii</i>)	7	4
Buřňák bělobradý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	12	4
Buřňák šedý (<i>Calonectris diomedae borealis</i>)	7	3
Buřňák holubí (<i>Pachyptila desolata</i>)	8	3
Buřňák obrovský (<i>Macronectes giganteus</i>)	6	2
Buřňák Hallův (<i>M. halli</i>)	6	4
Buřník georgijský (<i>Pelecanoides georgicus</i>)	8	3
Albatros černobrvý (<i>Thalassarche melanophris</i>)	8	2
Tučňák žlutorohý (<i>Eudyptes chrysolophus</i>)	8	7

Jedenáct dinukleotidových mikrosatelitů popsali Andris *et al.* (2010) u buřňáka Bulwerova, jejichž variabilita byla testována na 91 jedincích vždy při T_a 58 °C. U 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového dávaly polymorfní produkt 4 mikrosatelity. Bb20, Bb21 a Bb22 vykazovaly u plameňáka růžového polymorfismus se 2 alelami při T_a 54 °C, 56 °C a 58 °C. U zdrojového druhu autoři detekovali 7 alel u Bb20, 3 alely u Bb21 a 2 alely u Bb22. U Bb25 jsem pozorovala při T_a 56 °C 3 alely, zatímco autoři u buřňáka Bulwerova pozorovali alel 6. Andris *et al.* (2010) prováděli také *cross-species* PCR amplifikaci těchto mikrosatelitů u buřňáka bělobradého a modravého

z čeledi buňňákovití a mimo to i u buňňáčka Monteirova z čeledi buňňáčkovití, přičemž u buňňáka bělobradého vykazoval polymorfismus Bb22 a Bb25, u buňňáka modravého všechny 4 jmenované mikrosatelity a u buňňáčka Monteirova byly polymorfní Bb20 a Bb22; autoři neuvádějí počty alel.

Welch *et* Fleischer (2011) popsali 10 nových polymorfních mikrosatelitových lokusů izolovaných od buňňáka havajského, přičemž Ptero03 a Ptero05 vykazovaly polymorfismus se 2 alelami u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, kde jsem u Ptero03 použila T_a 48 °C a u Ptero05 T_a 62 °C. Autoři použili v obou případech T_a 53 °C a genotypizaci prováděli u 40 jedinců, detekovali 7 alel u Ptero03 a 3 alely u Ptero05.

Od buňňáka světlenohého Hardesty *et al.* (2013) izolovali 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů, ze kterých jsem určila u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového jako polymorfní se 2 alelami Pc B109 a Pc D103, při použití T_a 58 °C. U lokusu Pc D3 jsem při T_a 48 °C detekovala 2 polymorfní oblasti po 2 alelách. U Pc B109 autoři detekovali u 79 jedinců buňňáka světlenohého 5 alel při T_a 57,2 °C. U lokusů Pc D3 a Pc D103 autoři detekovali po 6 alelách, pro genotypizaci Pc D3 využili 82 jedinců a T_a 56 °C a pro genotypizaci Pc D103 84 jedinců a T_a 58,7 °C.

Moodley *et al.* (2015) izolovali 25 mikrosatelitových lokusů od buňňáka útlozobého. Variabilitu testovali u 77 jedinců a ve všech případech použili T_a 56 °C. Deset z těchto mikrosatelitů jsem určila jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. U Pacbel_07265, Pacbel_08867, Pacbel_10033, Pacbel_15327 a Pacbel_17986 jsem detekovala po 2 alelách, a to při T_a 62 °C, 50 °C, 54 °C, 60 °C a 62 °C. Pacbel_07265 byl přitom u zdrojového druhu polymorfní s 15 alelami, Pacbel_08867 zahrnoval 8 alel, Pacbel_10033 9 alel, u Pacbel_15327 autoři detekovali 8 alel a u Pacbel_17986 5 alel. Tři alely jsem u plameňáka růžového pozorovala u Pacbel_00386, Pacbel_08988 a Pacbel_17944 při T_a 55 °C, 66 °C a 58 °C. Autoři u buňňáka útlozobého detekovali v případě Pacbel_00386 11 alel, u Pacbel_08988 10 alel a u Pacbel_17944 12 alel. Stejnou T_a 59 °C jsem použila v případě lokusů Pacbel_09021 a Pacbel_09528, kde jsem u plameňáka růžového detekovala 4 a 5 alel. Moodley *et al.* (2015) určili Pacbel_09021 polymorfní se 17 alelami a Pacbel_09528 s 9 alelami. Autoři dále prováděli rozsáhlou *cross-species* PCR amplifikaci těchto mikrosatelitů u dalších druhů ze stejné čeledi, a to u 79 jedinců buňňáka holubího, u 118 jedinců buňňáka širokozobého, u 18 jedinců

buňáka Salvinova, u 35 jedinců buňáka hrdliččího, u 99 jedinců buňáka modravého a také u 6 jedinců buňáčka Wilsonova z čeledi buňáčkovití. Z 10 mikrosatelitů byly všechny u výše jmenovaných druhů polymorfni se 2 až 28 alelami, až na Pacbel_09528, Pacbel_15327 a Pacbel_17986, které byly monomorfní u buňáčka Wilsonova. Pro velké množství dat uvádím přehled těchto mikrosatelitových lokusů a počtu alel u jednotlivých druhů v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Přehled 10 lokusů odvozených od buňáka útlozobého, které byly polymorfni u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, a úspěšnost jejich *cross-species* PCR amplifikace u buňáka holubího, širokozobého, Salvinova, hrdliččího, modravého a u buňáčka Wilsonova z čeledi buňáčkovití. Ve sloupcích je uveden název daného lokusu (v závorce uvádím vždy počet testovaných jedinců) a počet alel pro jednotlivé testované druhy (Moodley *et al.*, 2010).

Název lokusu	Buňák holubí (79)	Buňák širokozobý (118)	Buňák Salvinův (18)	Buňák hrdliččí (35)	Buňák modravý (99)	Buňáček Wilsonův (6)
Pacbel_00386	13	11	10	2	13	2
Pacbel_07265	15	14	7	6	28	5
Pacbel_08867	9	5	6	6	10	2
Pacbel_08988	9	6	4	2	12	2
Pacbel_09021	22	18	12	6	22	2
Pacbel_09528	14	13	5	7	9	M
Pacbel_10033	9	10	6	5	9	4
Pacbel_15327	12	10	8	5	14	M
Pacbel_17944	13	12	8	8	10	4
Pacbel_17986	6	4	5	3	4	M

M – monomorfní

Od buňáka útlozobého Quillfedt *et al.* (2012) izolovali 7 mikrosatelitových lokusů, z nich jsem 2 určila jako polymorfni u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Testování prováděli na 68 jedincích buňáka útlozobého. Lokus Patbel3 vykazoval u plameňáka růžového polymorfismus se 2 alelami při T_a 55 °C, autoři přitom u zdrojového druhu detekovali 10 alel. Lokus Patbel7 jsem testovala při T_a 58 °C a detekovala jsem 4 alely, zatímco autoři detekovali alel 5. Quillfedt *et al.* (2012) v publikaci neuvádějí u žádného z mikrosatelitů T_a .

Dále jsem testovala 5 mikrosatelitových lokusů odvozených od 3 druhů z řádu dlouhokřídlí, ze kterých byly 2 u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového polymorfni. Konkrétně se jednalo o Calex-01 a RBG29. Calex-01, který byl izolovaný

od kulíka mořského z čeledi kulíkovití, jsem určila jako polymorfní u plameňáka růžového se 2 alelami při T_a 68 °C, zatímco Küpper *et al.* (2007) pozorovali při T_a 62 °C 10 alel, přičemž testování prováděli na 42 jedincích kulíka mořského. U lokusu RBG29 odvozeného od racka novozélandského z čeledi rackovití, u kterého Given *et al.* (2002) detekovali u 260 jedinců 5 alel při T_a 50 °C, jsem u plameňáka růžového detekovala stejný počet alel (5) avšak za použití T_a 60 °C.

U 6 nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) Janušová (2005) testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace všech 213 mikrosatelitových lokusů, které byly polymorfní u ptáků z řádu trubkonosí. Z celkového počtu 213 mikrosatelitů detekovala u potápky roháče celkem 20 polymorfních lokusů se 2–8 alelami. Deset z těchto mikrosatelitových lokusů bylo zároveň polymorfních u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového.

Dále všechny mikrosatelity (213), které byly polymorfní u ptáků z řádu trubkonosí, testovala Strejčková (2016) na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Podařilo se jí amplifikovat celkem 50 polymorfních mikrosatelitových lokusů s počty alel od 2 do 5. Dvacet devět z testovaných mikrosatelitových lokusů bylo přitom polymorfních zároveň u plameňáka růžového a karibského. Velký počet mikrosatelitů vykazujících polymorfismus je pravděpodobně způsoben tím, že plameňák růžový a karibský jsou velmi příbuzné druhy, které někteří autoři řadí dokonce jako 2 poddruhy téhož druhu (del Hoyo *et al.*, 1992).

Celkově 7 mikrosatelitových lokusů bylo polymorfních zároveň u všech tří srovnávaných druhů – plameňáka růžového, karibského a potápky roháče, konkrétně se jednalo o lokusy Dc5, Oc49, Ol10-39, Omn8, Bb21, Pc B109 a Pc D103. Výsledky srovnání polymorfních lokusů u těchto 3 druhů uvádím v tabulce č. 8.

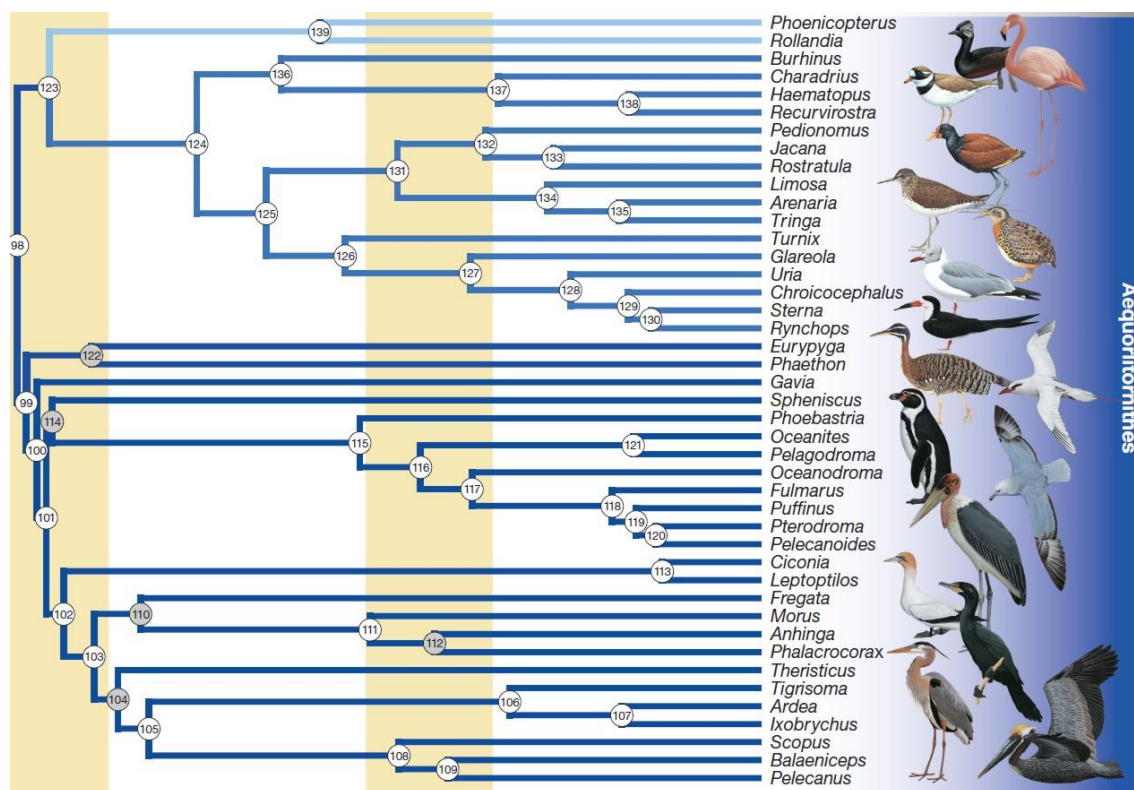
Tabulka č. 8: Mikrosatelity polymorfní u zástupců z řádu trubkonosí, které byly polymorfní zároveň u plameňáka růžového, plameňáka karibského a/nebo potápky roháče. Ve sloupcích je uveden název mikrosatelitového lokusu, zdrojový druh a počty alel detekované u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (tato práce), karibského (Strejčková, 2016) a potápky roháče (Janušová, 2015).

Lokus	Zdrojový druh	Plameňák růžový	Plameňák karibský	Potápka roháč
Dc5	Albatros šedohlavý	3	2	4
Dc31		2	3	M
LAAL7	Albatros laysanský	3	5	M
LAA19		4	3	M
Oc28B	Buřňáček madeirský	3	2	M
Oc49		5	3	3
Oc63		2	2	M
OI10-39	Buřňáček dlouhokřídlý	3	2	8
Ole02		5	5	M
Ole09		5	2	M
Omn8	Buřňáček Monteirův	5	3	6
Paequ3	Buřňák bělobradý	4	2	M
Cd5	Buřňák šedý	2	2	M
Tch6	Buřňák taiko	3	M	2
Parm01	Buřňák trinidadský	4	4	M
Puff G2F	Buřňák baleárský	2	3	M
Bb21	Buřňák Bulwerův	2	2	5
Bb22		2	2	M
Bb25		3	3	M
Ptero05	Buřňák havajský	2	2	M
Pc B109	Buřňák světlenohý	2	3	5
Pc D3 *		2+2	M	3
Pc D103		2	2	2
Pacbel_00386	Buřňák útolozobý	3	3	M
Pacbel_07265		2	3	M
Pacbel_08988		3	3	M
Pacbel_09021		4	2	M
Pacbel_09528		5	2	M
Pacbel_10033		2	2	M
Pacbel_17944		3	3	M
Pacbel_17986 *		2	M	2
RBG29		Racek novozélandský	5	4

M – monomorfní

* – Mikrosatelity, které Strejčková (2016) označila jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, ovšem při rozsáhlejší testování na 30 jedincích zjistila, že jsou monomorfní (Strejčková, osobní sdělení).

Zařazení plameňáků do systému je problematické a v průběhu let bylo mnohokrát měněno (Hackett *et al.*, 2008, Jarvis *et al.*, 2014 a další). Nejnovější studie autorů Prum *et al.* (2015) zařazuje plameňáky (plameňáka růžového) do kladu Aequorlornithes (viz obrázek č. 4) společně se všemi vodními ptáky s výjimkou vrubozobých.



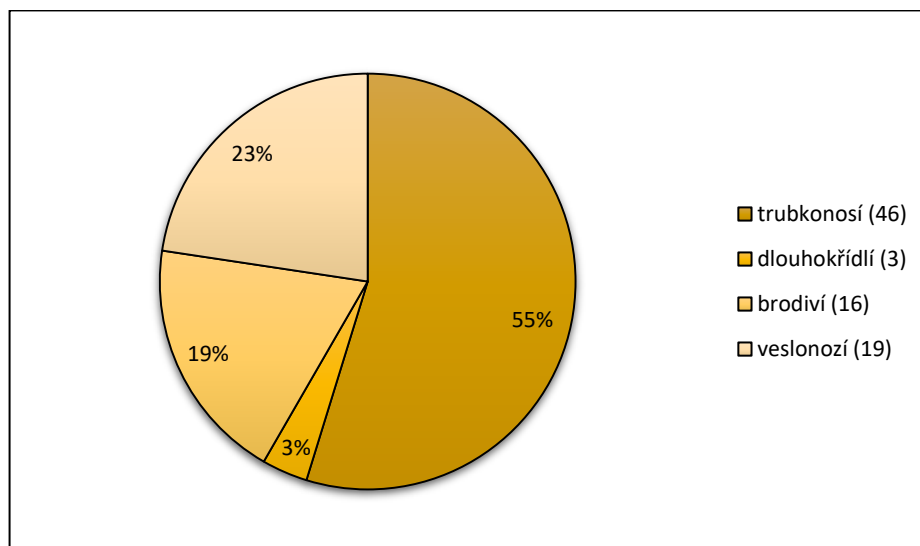
Obrázek č. 4: Klad Aequorlornithes zahrnující plameňáky – výřez kladogramu ptáků dle nejnovějších analýz (Prum *et al.*, 2015).

U plameňáka růžového bylo dosud testováno 563 mikrosatelitů odvozených od druhů z řádů trubkonosí, dlouhokřídlí, pěvci, brodiví, veslonozí, potápky, vrubozobí, potáplice a tučňáci, ze kterých bylo 84 mikrosatelitových lokusů polymorfních a hodnotitelných, přitom 46 polymorfních mikrosatelitové lokusů bylo původně odvozeno od trubkonosých (tato práce), 3 mikrosatelity od dlouhokřídlých (tato práce, Drobek, 2010), 16 mikrosatelitů od brodivých (Drobek, 2010, Manišová, 2011, Málková, 2013) a 19 mikrosatelitů od veslononohých (Drobek, 2010, Manišová, 2011). Grafické rozdělení mikrosatelitů polymorfních u plameňáka růžového podle řádů, od kterých byly odvozeny, je uvedeno v grafu č. 3.

Z kladogramu vyplývá, že sesterskou skupinou k plameňákům jsou potápky a tyto dvě skupiny dohromady jsou sesterskou skupinou k dlouhokřídlým. Všechny jmenované skupiny jsou přitom dohromady sesterskou skupinou ke zbytku ptáků kladu

Aequorlornithes. Úspěšnost nalezení polymorfního lokusu u plameňáka růžového v případě PCR amplifikace pomocí párů primerů navržených pro řád trubkonosí (tato práce) byla 22,50 %. Mikrosatelity z řádu brodiví dosáhly 12,40% a z řádu veslonozí 11,96% úspěšnosti polymorfní amplifikace (Drobek, 2010), zatímco Manišová (2011) ve své práci detekovala úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitového lokusu 16,7 % v případě párů primerů navržených pro brodivé a 8,6 % úspěšnost pro páry primerů navržené pro veslonohé.

Graf č. 3: Grafické rozdělení mikrosatelitů, které byly polymorfní u plameňáka růžového, podle řádů (v pojetí tradičního systému), od nichž byly odvozeny: trubkonosí, dlouhokřídlí, brodiví, veslonozí. U jednotlivých mikrosatelitových lokusů je uveden počet a četnost v rámci všech polymorfních mikrosatelitů (tato práce, Drobek, 2010, Manišová, 2011, Málková, 2013).



Bylo by vhodné testovat další mikrosatelitové lokusy navržené pro zástupce dalších řádů od ptáků ze skupiny *Aequorlornithes* a najít tak nové polymorfní mikrosatelity pro plameňáka růžového. Zejména se jedná o mikrosatelitové lokusy odvozené od druhů z řádu dlouhokřídlí, kde je popsáno více než 350 mikrosatelitů, avšak u plameňáka růžového bylo doposud testováno pouze 7, z nichž 3 byly polymorfní. Konkrétně šlo o mikrosatelity RBG29, Calex-01 (tato práce) a Apy06, který byl odvozený od alkounka drobného (*Aethia pygmaea*) (Drobek, 2010). Vzhledem k tomu, že dlouhokřídlí jsou blízce příbuzní plameňákům (obrázek. č. 4) a že úspěšnost získání polymorfního mikrosatelitu od zástupců kladu *Aequorlornithes* je přibližně 15 %, by mohlo toto testování přinést dalších 50 až 60 polymorfních mikrosatelitů pro plameňáka růžového.

7 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace celkem 213 mikrosatelitových lokusů, které byly polymorfní u druhů z řádu trubkonosí, na genomické DNA 6 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Pro druhy z řádu trubkonosí (Procellariiformes) bylo navrženo *de novo* 207 mikrosatelitových lokusů, přičemž 53 mikrosatelitů bylo odvozeno od druhů z čeledi albatrosovití, 54 od druhů z čeledi buňňáčkovití a 100 od druhů z čeledi buňňákovití. Zbylých 6 mikrosatelitových lokusů bylo odvozeno od druhů z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pěvci (Passeriformes) – tedy 5 lokusů odvozených od dlouhokřídlých, kdy bylo vždy po 1 navrženo pro druhy z čeledi alkovití a kulíkovití a 3 pro racka novozélandského z čeledi rackovití; a 1 lokus odvozený od lesňáčka žlutonohého z řádu pěvci. Tyto lokusy vykazovaly polymorfismus u trubkonosých.

Z celkového počtu 213 testovaných mikrosatelitových lokusů bylo u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 164 monomorfních, 48 polymorfních a jeden mikrosatelit byl určen jako nehodnotitelný, a tudíž vyloučen z analýz, proto byla úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitového lokusu v této práci 22,5 %. Dále u 2 mikrosatelitových lokusů jsem detekovala 2 polymorfní oblasti vždy po 2 alelách. Celkem jsem tedy za použití 48 párů primerů detekovala 50 polymorfních PCR produktů. Úroveň polymorfismu se u hodnocených mikrosatelitů pohybovala od 2 do 5 alel.

Největší úspěšnost polymorfismu (26 %) při *cross-species* PCR amplifikaci vykazovaly mikrosatelitové lokusy z čeledi buňňákovití, kde z celkového počtu 100 testovaných lokusů bylo 26 polymorfních. Z 54 testovaných mikrosatelitových lokusů z čeledi buňňáčkovití bylo 12 polymorfních, úspěšnost tedy byla 22,2 %. Naopak nejmenší úspěšnost nalezení polymorfního lokusu (15,1 %) jsem detekovala u lokusů navržených pro druhy z čeledi albatrosovití, kde polymorfismus vykazovalo 8 z 53 lokusů. Zbývající 2 polymorfní mikrosatelitové lokusy byly odvozeny od dlouhokřídlých. Jednalo se o Calex-01, izolovaný od kulíka mořského z čeledi kulíkovití, a lokus RBG29, odvozený od racka novozélandského z čeledi rackovití. Vzhledem k malému počtu testovaných mikrosatelitových lokusů od zástupců z řádu dlouhokřídlí neuvádím procentuální úspěšnost. V budoucnu by bylo vhodné dále testovat více mikrosatelitů odvozených od zástupců Aequorlitorornithes (přednostně od dlouhokřídlých) u plameňáka růžového, pro nalezení dalších polymorfních markerů.

8 Seznam zkratek

A	adenin
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOP-PCR	PCR reakce s degenerovanými oligonukleotidovými primery
ESTs	místa s expresní adresou (Expressed Sequence Tags)
G	guanin
PCR	polymerázová řetězová reakce
RAPD	náhodně amplifikovaná polymorfní DNA
SSRs	jednoduché repetitivní sekvence
STRs	krátké tandemové repetice
T	thymin
VNTRs	variabilní počty tandemových repetic

9 Použitá literatura

- Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuskript, publikováno online na: <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>, navštíveno dne: 24. 2. 2017
- 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., Horsburgh, G. J., Knight, M. E., Bilton, D. T., Votier, S. C. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's storm-petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). *Conservation Genetics Resources*, 3, 711–716.
- BirdLife International (2016): *Phoenicopterus roseus* (On-line). The IUCN Red List of Threatened Species 2016. publikováno online na: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22697360A86051591.en>, navštíveno dne: 8. 3. 2017.
- Bried, J., Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.
- Bried, J., Dubois, M.-P., Jouventin, P., Santos, R. S. (2008): Eleven polymorphic microsatellite markers in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*, and cross-species amplification on threatened Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 8, 602–604.
- Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009): Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology*, 150, 925–929.
- Burg, T. M. (1999): Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology*, 8, 338–341.

- Burg, T. M., Croxall, J. P. (2001): Global relationships amongst black-browed and grey-headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. *Molecular Ecology*, 10, 2647–2660.
- Burg, T. M., Croxall, J. P. (2004): Global population structure and taxonomy of the wandering albatross species complex. *Molecular Ecology*, 13, 2345–2355.
- Černý, W., Černý, J., Drchal, K. (1980): Ptáci. Artia, Praha.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica patechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*, 79, 506–514.
- Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, Á., Krupa, A. P., Lee, J.-W., Martín-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L. G., Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.
- Dubois, M.-P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 905–907.
- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.
- Drobek, A. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Field, D., Wills, C. (1998): Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Biological Science*, 263, 209–215.
- Friesen, V. L., González, J. A., Cruz-Delgado, F. (2006): Population genetic structure and conservation of the Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Conservation Genetics*, 7, 105–115.
- Friesen, V. L., Smith, A. L., Gómez-Díaz, E. (2007): Sympatric speciation by allochrony in seabird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18589–18594.

- Gaisler, J., Zima, J. (2007): Zoologie obratlovců. Academia – nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Galbusera, P., van Dongen, S., Matthysen, E. (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics*, 1, 163–168.
- Glenn, T. C., Schable N. A. (2005): Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 395, 202–222.
- Given, A. D., Mills, J. A., Baker, A. J. (2002): Isolation of polymorphic microsatellite loci from the red-billed gull (*Larus novaehollandiae scopulinus*) and amplification in related species. *Molecular Ecology Notes*, 2, 416–418.
- Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwater, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1044–1046.
- Gosler, A. (1994): Atlas ptáků světa, 1. české vyd. Příroda, Bratislava.
- Hamilton M. B., Pincus E. L., Fleischer R. C. (1999): Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*, 27, 500-515.
- Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2013): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources*, 5, 27–29.
- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, C. C., Yuri, T. (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science*, 320, 1763–1768.
- 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.

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

Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y. W., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A., Weber, C. C., da Fonseca, R. R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W. C., Ray, D., Green, R. E., Bruford, M. W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y., Derryberry, E. P., Bertelsen, M. F., Sheldon, F. H., Brumfield, R. T., Mello, C. V., Lovell, P. V., Wirthlin, M., Schneider, M. P. C., 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, Á., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Major, Á., Lee, P. L. M., Hoffmann, G., Mátics, R., Dawson, D. A. (2009): Microsatellite markers characterized in the barn owl and of high utility in other owls (Strigiformes: AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1512–1519.

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.

- Lai, Y., Sun, F. (2003): The Relationship Between Microsatellite Slippage Mutation Rate and the Number of Repeat Units. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 2123–2131.
- Lawrence, H. A. (2008): Conservation Genetics of the World's Most Endangered Seabird, the Chatham Island Tāiko. Dissertation. Auckland, Nový Zéland, publikováno online na: <http://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>, navštíveno dne 1. 3. 2017.
- Málková, B. (2013): Analýza a charakteristika polymorfních cross-species mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Manišová, B. (2011): Analýza vybraných polymorfních cross-species mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimanda, G. K., Thali, M. R., Alderman, R., Cuthbert, R. J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Phillips, R. A., Ryan, P. G., Suazo, C. G., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046–1058.
- Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M., Hetzel, D. J. (1991): The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10, 654–660.
- Moxon, R., Wills, C. (1999): DNA microsatellites: Agents of evolution? *Scientific American*, 280, 94–99.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Primmer, C. R., Møller, A. P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365–378.
- Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Møller, A. P., Ellegren, H. (1997): Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research*, 7, 471–482.

- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo, J. U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36, 348–360.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153, 367–373.
- Queller, D. C., Strassmann, J. E., Hughes C. R. (1993): Microsatellites and Kinship. *Tree*, 8, 285-288.
- 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): Primer 3 on the WWW for general users and for biologists programmers. In: Miesner S, Krawetz SA (eds.) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Human Press Inc., Totowa, 365–386.
- Selkoe, K. A., Toonen, R. J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9, 615–629.
- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365–371.
- Schlötterer, C., Amos, B., Tautz, D. (1991): Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, 354, 63–65.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka karibského (Phoenicopterus ruber)*. Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- 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.

- 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.
- Torres, C. R., Ogawa, L. M., Gillingham, M. A. F., Ferrari, B., van Tuinen, M. (2014): A multi-locus inference of the evolutionary diversification of extant flamingos (Phoenicopteridae). *BMC Evolutionary Biology*, 14.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R.:(1991): Chelex 100 as a medium for PCR based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506–513.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 581–584.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1–16.