

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie a ornitologická laborato



***Cross-species amplifikace mikrosatelit z řádu trubkonosí
u nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*)***

Diplomová práce

Bc. Magdalena Nedvředová

Studijní program : Biologie

Studijní obor : Zoologie

Forma studia : Prezenční

Olomouc 2015

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

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

V Olomouci dne 21.4. 2015

í í í í í í í í í í í í í í ..

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytl při vypracování teoretické i experimentální části mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat kolektivu Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Pěstovnické fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Souhrn

Ve své diplomové práci jsem hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) metodou *cross-species* PCR amplifikace. Testovala jsem mikrosatelitové lokusy, které byly polymorfní u zástupců řádu trubkonosí (Procellariiformes).

V teoretické části mé diplomové práce jsem uvedla základní charakteristiku řádu brodiví (Ciconiiformes), zejména eledí apovití (Ciconiidae). Zvláště pozornost jsem v novale rodu nesyt (*Mycteria*) a jednu kapitolu jsem v novale popisu nesyta indomalajského. Dále jsem se zabývala charakteristikou řádu trubkonosí, uvedla jsem základní fakta o mikrosatelitech a teoreticky jsem popsala metodu *cross-species* PCR amplifikace. Zároveň jsem uvedla charakteristiku všech mikrosatelitových lokusů, které byly polymorfní u zástupců řádu trubkonosí.

V praktické části mé práce jsem hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy u nesyta indomalajského. Použila jsem metodu *cross-species* PCR amplifikace a testovala jsem 212 mikrosatelitových lokusů, z toho 207 lokusů pocházejících od druhů řádu trubkonosí, 4 mikrosatelitové lokusy pocházející od zástupců řádu dlouhokřídlí a 1 mikrosatelitový lokus pocházející od druhu z řádu pvcí. Všechny tyto lokusy byly polymorfní u zástupců řádu trubkonosí.

U nesyta indomalajského jsem našla celkem 46 polymorfních mikrosatelitových lokusů, přičemž 2 mikrosatelitové lokusy jsou totožné, a proto jsem našla celkem 45 unikátních mikrosatelitových lokusů. Z těchto lokusů pocházelo 43 od druhů z řádu trubkonosí a 2 byly popsány u zástupců řádu dlouhokřídlí. Pro tyto lokusy jsem určila optimální teploty nasedání primerů, metody elektroforetické separace a genotypy 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského. Počet alel se pohyboval v rozmezí 2-65.

Summary

In my master thesis, I was searching the polymorphic microsatellite loci of the Painted stork (*Mycteria leucocephala*) and I used the method of cross-species PCR amplification. I tested microsatellite loci, which were polymorphic in species of the order Procellariiformes.

In a theoretical part of my thesis, I firstly concisely characterized the order Ciconiiformes, especially the family Ciconiidae. I focused on the genus *Mycteria* and I described the Painted stork in one chapter. Secondly, I wrote few information about the order Procellariiformes, I provided basic facts about microsatellites and I theoretically described the method of cross-species PCR amplification. Finally, I characterized all microsatellites, which were described in the order Procellariiformes and a couple of microsatellites described in the orders Charadriiformes and Passeriformes.

I was looking for the polymorphic microsatellite markers of the Painted stork in the practical part of my master thesis. I used the method of cross-species PCR amplification and I tested overall 212 microsatellite loci, 207 of these loci were described in species of the order Procellariiformes, 4 microsatellite markers were described in species of the order Charadriiformes and 1 microsatellite marker from species of the order Passeriformes. All of these loci were polymorphic in species of the order Procellariiformes.

I found overall 46 polymorphic microsatellite markers, two of these markers were identical, so I found 45 unique polymorphic microsatellite loci. From these loci, 43 were described in species of the order Procellariiformes and 2 loci were described in species by the order Charadriiformes. For these microsatellites I identified the optimal annealing temperatures, optimal time of electrophoretic separation and genotypes of 6 unrelated individuals of Painted stork. The number of alleles varied between 2 and 5.

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíle práce	8
3. Literární pohled	9
3.1 řád brodiví.....	9
3.1.1 ele pápovití	9
3.1.2 Rod nesyt	10
3.1.3 Nesyt indomalajský.....	11
3.2 řád trubkonosí	13
3.3 Mikrosatelity	14
3.4 <i>Cross-species</i> mikrosatelity	16
3.5 Mikrosatelity popsané u druhů z řádu trubkonosí	17
3.5.1 Mikrosatelity popsané u druhů zeledi albatrosovití	17
3.5.2 Mikrosatelity popsané u druhů zeledi buřákovití.....	19
3.5.3 Mikrosatelity popsané u druhů zeledi buřákovití.....	25
4. Materiál a metody.....	27
4.1 Biologický materiál	27
4.2 Mikrosatelity amplifikované u nesyta indomalajského	27
4.2.1 PCR amplifikace	31
4.2.2 Elektroforetická separace PCR produkt	32
4.3 Seznam použitých chemikálií.....	34
4.4 Seznam použitých roztoků	35
4.5 Seznam použitých přístrojů	37
5. Výsledky	38
6. Diskuze	48
7. Závěr	57
8. Seznam zkratk	58
9. Literární zdroje	59

1. Úvod

Mikrosatelity jsou v současné době jedny z nejpoužívanějších molekulárních markerů, a to z mnoha důvodů. Jejich výhodou je kodominance, velký počet alel a výrazný délkový polymorfismus. Také mají vysokou mutační rychlost oproti jiným typům molekulárních markerů. Mikrosatelity se využívají zejména ke zkoumání populační struktury a analýze rodů. Hlavní nevýhodou mikrosatelit je dlouhá a nákladná fáze hledání, navíc musí být izolovány *de novo* pro každý zkoumaný druh. Tento problém řeší *cross-species* PCR amplifikace, která u ptáků probíhá úspěšně. Jsou tak nalezeny univerzální molekulární markery, které jsou společné mezi druhy.

Nesyt indomalajský (*Mycteria leucocephala*) je zástupce eledí ápovití (Ciconiidae) v Indii a sousedních zemích. Je téměř vyhuben a a koliv je předmětem ochrany v mnoha zemích, počet jedinců nadále klesá. Fylogenetické vztahy v eledí ápovití a v řádu brodiví (Ciconiiformes), obzvláště ve vztahu k veslonohým (Pelecaniiformes) jsou stále předmětem zkoumání a metoda *cross-species* PCR amplifikace je ideální metodou pro zkoumání fylogenetických vztahů a populační struktury ohrožených druhů.

Úkolem mé práce je nalezení polymorfních mikrosatelitových lokusů u nesyta indomalajského za využití metody *cross-species* PCR amplifikace včetně dosud popsaných mikrosatelitových lokusů od zástupců druhů z řádu trubkonosů (Procellariiformes) a několika vybraných lokusů popsaných u zástupců řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pvcí (Passeriformes), které vykazovaly polymorfismus u trubkonosů.

2. Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování reference na téma diplomové práce.
3. PCR amplifikace DNA nesyta indomalajského s využitím *cross-species* primerů, které jsou polymorfní u ptáků z řádu trubkonosí.

3. Literární přehled

3.1 řád brodiví

Mezi brodivé (Ciconiiformes) patří středně velcí až velcí ptáci s širokými křídly, díky kterým jsou dobrými a rychlými letci. Typickým znakem je brodivá noha s nízko nasazeným palcem, který zvláště nábíjí plochu nohy. Zástupci řádu brodiví se flíví výhradně flívou potravou, a to převážně vodními flívou ichy. Brodiví často tvoří hnízdní kolonie a svá hnízda si staví v blízkosti vody. Jejich rozšíření je kosmopolitní s ohniskem v teplých oblastech. řád brodiví byl původně rozdělen do 5 řádů, které se liší tvarem zobáku. Jsou to volavkovití (Ardeidae), kladivoušovití (Scopidae), lunozobcovití (Balaenicipitidae), řápovití (Ciconiidae) a ibisovití (Threskiornithidae). (Mastný *et al.*, 1998)

Mayr (2003) na základě morfologických znaků potvrdil, že řád lunozobcovití (Balaenicipitidae) a pelikánovití (Pelecanidae) tvoří monofyletickou skupinu, lunozobcovití by tak patřili do řádu veslonozí (Pelecaniformes). V dalším své studii morfologických znaků k nim připojil ještě kladivoušovití (Scopidae) (Mayr, 2008) a tyto fylogenetické vztahy potvrdili na základě analýzy jaderných genomů i Ericson *et al.* (2006).

Gibb *et al.* (2013) provádějí analýzu kompletních mitochondriálních genomů vodních masožravých ptáků zahrnující veslonohé (Pelecaniformes) a brodivé (Ciconiiformes). Data získaná z analýzy mitochondriálních genomů se shodovala s daty, která byla dříve získána z analýzy jaderných genomů (Hackett *et al.*, 2008). Podle této studie jsou řády volavkovití (Ardeidae), kladivoušovití (Scopidae), lunozobcovití (Balaenicipitidae) a ibisovití (Threskiornithidae) blíže příbuzné s druhy patřícími do řádu veslonozí (Pelecaniformes). Že řápovití tak tvoří samostatnou skupinu a mohla by to být jediná ze řádů brodiví. (Gibb *et al.*, 2013)

3.1.1 řád řápovití

Zástupci řádu řápovití (Ciconiidae) jsou velcí ptáci s dlouhými nohama, krkem a dlouhým klínovitým zobákem. Na rozdíl od volavek mají v letu natažený krk (výjimkou je řáp marabu). Mají dlouhá a široká křídla, která vyuffívají k plachtění. Jejich zbarvení je většinou černobílé. U řápovitých nebyl pozorován výrazný pohlavní dimorfismus, samice jsou pouze menší než samci. Mezi těmi předními prsty mají řápovití plovací

blánu. Hlasové ústrojí ápovitých je zakrnělé, dorozumívají se klapáním zobáku a syčivými hlasy. (Mastný *et al.*, 1998, Gaisler *et Zima*, 2007)

Ápovití se vyskytují kromě extrémně chladných oblastí kosmopolitně. Většina druhů ale hnízdí v tropech. Ti, kteří obývají chladnější biotopy, odlétají na zimu do míst s vyšší teplotou (většinou Afrika nebo Asie). Jejich přirozeným ekosystémem jsou stepi nebo lesostepi, hnízdí v blízkosti vodních ploch, mokřadů nebo mokřadů. Ápovití hnízdí na vyvýšených místech, často na stromech. V České republice hnízdí áp bílý (*Ciconia ciconia*) a áp černý (*C. nigra*). (Mastný *et al.*, 1998, Gaisler *et Zima*, 2007)

Potrava ápovitých je velmi rozmanitá, mohou to být například drobné ryby, plíseň, řávy, plazi a větší hmyz. Většiny druhy jsou masožravé. Potravu loví v mělké vodě a na které i na souši. Zástupci rodu marabu poplávají mršiny. Ápovití za potravou mohou migrovat na velké vzdálenosti. (Mastný *et al.*, 1998)

Ápovití hnízdí jednotlivě nebo v koloniích, někdy i s jinými druhy vodních ptáků (například s pelikány, volavkami a ibisy). Jsou monogamní a mohou tvořit trvalé páry. Při koloniálním hnízdění je samec obráncem hnízda, ke kterému láká samici. Samice klade 266 vajec, oba rodiče se účastní inkubace. Oba rodiče se také podílejí na krmení mláďat (mláďata jsou krmivá). Ápovití se dožívají vysokého věku, například áp bílý se v zajetí dožívá až 48 let. Některé druhy zeledi ápovití jsou kriticky ohrožené, a to hlavně díky úbytku přirozených hnízdních biotopů, zejména mokřadů. (Mastný *et al.*, 1998)

Je známo 19 druhů ápovitých z celkem 6 rodů. Elliott (1992) rozdělil je do tří tribů šobrovití ápiš (Leptoptilini), mezi které patří zástupci rodu marabu (*Leptoptilos* spp.), áp jabiru (*Jabiru mycteria*) a ápi rodu *Ephippiorhynchus*. Další tribus tvoří šlesní ápiš (Mycteriini), kam patří 4 druhy rodu nesyt (*Mycteria* spp.) a dva druhy rodu zejozob (*Anastomus* spp.). Zbývající druhy, tzn. zástupci rodu *Ciconia* tvoří tribus štýpiti ápiš (Ciconiini). (Elliott, 1992)

Jele ápovití je monofyletická skupina, která je dobře definovaná, ale vztah ápovitých k dalším skupinám vodních ptáků se dále zkoumá. Podle analýz DNA byla jele umístěna do řádu brodiví (Ciconiiformes) a oddělena od řádu veslonožů (Pelecaniformes) a terejovců (Suliformes). (Hackett *et al.*, 2008)

3.1.2 Rod nesyt

Do rodu nesyt (*Mycteria*) patří 4 druhy: nesyt americký (*M. americana*), nesyt bílý (*M. cinerea*), nesyt africký (*M. ibis*) a nesyt indomalajský (*M. leucocephala*). Tyto

druhy patří do tribu šlesníchápů (Mycteriini) a byly zařazeny do stejného rodu na základě genetických morfologických a behaviorálních homologií. (Hancock *et al.*, 1992)

Nesyt bílý je převážně bílý pták, jeho ocasní pera jsou lesklá a zeleno-černá, stejně jako pera na křídlech. Neoperná obličejová část má výraznou červenou barvu. Nesyt bílý se vyskytuje v jihovýchodní Asii, konkrétně v Malajsii, Kambodži a v Indonésii. Obývá pobřežní regiony, hlavně mangrovové porosty a mokřady. Živí se rybami, obojživelníky a dalšími vodními živočichy. Nesyt bílý tvoří hnízdní kolonie a samice klade 164 vajec. Nesyt bílý patří mezi ohrožené druhy, a to zejména díky úbytku mangrovových porostů a lovu. Ochrana nesyta bílého v současné době probíhá hlavně v Malajsii. (Anonymous, 2013A)

Nesyt africký je velký bílý pták s dlouhým flutým lehce zahnutým zobákem. Jeho ocas je černý se zelenofialovým leskem. Perá na hlavě zasahují až k očím a jen malá část obličeje je neoperná a červeně zbarvená. Nesyt africký se vyskytuje ve východní Africe, jeho rozšíření může zasahovat i do jižní Afriky. Dalšími místy jeho výskytu je Madagaskar. Loví převážně ryby a to v mokřadech, mělkých jezerech a dalších mělkých vodách. Nesyt africký hnízdí v koloniích a samice klade 264 vajec. Tento druh není považován za ohrožený, potenciální nebezpečí představují pytláci. (Hancock *et al.*, 1992, Anonymous, 2013B)

Nesyt americký je pták bílé barvy s černými pery na konci křídel a s černošedým zobákem. Obličejová část hlavy je holá a tmavě hnědá. Nesyt americký se vyskytuje převážně v jižní a střední Americe a Karibiku, malé populace byly zaznamenány i v USA. Živí se vodními živočichy a hnízdí v koloniích v blízkosti otevřených mokřadů nebo rýflových polí. Počet vajec ve snůžce bývá obvykle 365 (Hancock *et al.*, 1992). Nesyt americký není zařazen mezi ohrožené druhy. Nebezpečím pro něj může být znečištění jeho přirozených habitatů, zejména mokřadů, ve kterých se mohou vyskytovat vysoké koncentrace škodlivých prvků, například rtuť. (Brant *et al.*, 2002)

3.1.3 Nesyt indomalajský

Systematické zařazení nesyta indomalajského (podle Geisler *et Zima*, 2007):

Řečeno: živočišné (Animalia)

Kmen: Strunatci (Chordata)

Podkmen: Obratlovci (Vertebrata)

Třída: Ptáci (Aves)

Řád: Brodiví (Ciconiiformes)

Čeleď: Čápovití (Ciconiidae)

Třída: Lesní čápi (Mycteriini)

Rod: Nesyt (*Mycteria*)

Druh: Nesyt indomalajský (*Mycteria leucocephala*)

Nesyt indomalajský je velký pták s výškou okolo 100 cm. Pohlavní dimorfismus u něj není výrazný, stejně jako u ostatních zástupců čeledi. Krk a tělo nesyt indomalajského je bílé, v prsní části se táhne vodorovný černý pruh. Křídla jsou černobíle pruhovaná se zeleným leskem. Větší pera v zadní části těla mají červenou barvu a ocas je černý. Zobák je sýť oranžový, extrémně dlouhý a na konci lehce zahnutý. Obloučková část nesyt indomalajského je holá a sýť oranžová. Nohy má dlouhé s dlouhými prsty. (Whistler, 1940)

Typický výskyt nesyt indomalajského je zejména na Indickém subkontinentu, kde je početný a jeho rozšíření zasahuje i do jihovýchodní Asie. Může se vyskytovat vzácně v Nepálu, Pákistánu, Bangladéši, Íránu, Vietnamu, Thajsku a dalších státech. Jeho přirozeným habitatem jsou sladkovodní bažiny, jezera, zaplavená pole nebo mokřiny při ústí říek. Hnízdí na stromech, které rostou v podmáčených lokalitách. (Anonymous, 2012)

Nesyt indomalajský loví hlavně drobné ryby, někdy i kraby nebo fláby. Jeho způsob lovu je specifický, protože nesyt potopí svůj naplněný zobák a prohledává vodu, dokud nenarazí na potravu. V zobáku se nacházejí speciální dotekové receptory, které ho upozorní na přítomnou kořist. Další zajímavostí je, že nesyt vídí bahno ve vodě, aby objevil i skrytou kořist. Proto loví v mělké vodě do hloubce 12625 cm. V těchto hloubkách se obvykle vyhýbá. (Kalam *et* Urfi, 2008)

Nesyt indomalajský hnízdí ve velkých koloniích, někdy i s dalšími vodními ptáky, jako jsou volavky nebo kormoráni. Hnízda si staví na vysokých stromech na ostrůvčích nebo na místech, kde není rušeno. Hnízdní sezóna začíná krátce po monzúně, tj. v polovině srpna nebo na začátku září a pokračuje až do dubna. Snůžka obsahuje 265 vajec, inkubační doba trvá asi měsíc. Mláďata jsou krmivá, rodiče jim podávají předřvákané ryby. (Meganathan *et* Urfi, 2009)

A koli je nesyť indomalajský nejhojn ěím zástupcem ěpovitých v Indii, je označován jako těm vyhubený. Populace nesytů zařívají pokles. Hlavními d vody jsou lov, zne ět ění a úbytek míst k hnízd ění, hlavn ě mok ad . Mnohé oblasti vřkytu nesytů indomalajského jsou dnes chrán ěné a dal-ě záchranně akce jsou plánovány. (Anonymous, 2012)

3.2 ěd trubkonosě

Zástupci ědu trubkonosě (Procellariiformes) se li-ě svojě velikostě. Majě dlouhā k ědla s dlouhou loketně ěstě, na které se nachāzě afl 37 letek. Ru ěně ěst k ědla je zpravidla krat-ě. Tato stavba k ědla umořl uje efektivně placht ěně. Typickěm znakem jedinc ě z ědu trubkonosě jsou trubicovit ě protařleně nozdry, které nejspě- slouřlě k vněmāně proud ěně vzduchu. Do nozder śstě vřvody řlāz, ze kterých je vylu ovāna s l. Trubkonosě majě dob ě vyvinutou ěchovou sliznici a velkě ěchově laloky, z ěhořl vylpřvā, řl ěch je pro n ě d ěřlětěm smyslem. (Mastněy *et al.*, 1998, Gaisler *et Zima*, 2007)

Dal-ěm determināněm znakem je zobāk, jehořl rohovina je slořlenā z destěk. P ědně ěst p řdu-ice majě trubkonosě rozd ělenou podělněm septem, cořl je jejich spole něy znak s tu řāky. Dal-ěm spole něm znakem s tu řāky je velkā kostr ěně řlāza. Jejich noha je plovacě. (Gaisler *et Zima*, 2007)

Trubkonosě se vyskytují zejměna na řlěně polokouli a jsou vāzāni na mo ě, kde trāvě v t-ěnu řasu. Na sou-ě se objevují pouze v dob ě rozmnořlovaně. P ěstoflě v ěskě republice řlādně druh z ědu trubkonosě nehnězědě, mohou se zde vřjime n ě objevit. Jejich potravu tvo řě mo -tě řlivo ěchově, nap řklad korě-ě, medśzy, hlavonořlěi a ryby. Svoji potravu lově trubkonosě za letu, mohou se za svou ko ěstě i potopit. N které druhy lově za tmy. (Mastněy *et al.*, 1998, Gaisler *et Zima*, 2007)

Trubkonosě řlějě v t-ěnou ve velkěch koloněch a jsou monogamně. Samice kladou jedno vejce na zem (albatrosi) nebo do nor (v t-ěna bu řāk). Mlād ě je krmivě a p řod lāvā dlouhě vřvoj. (Mastněy *et al.*, 1998)

Podle Mastněho *et al.* (1998) zahrnuje ěd trubkonosě 112 druh ě. Podle nov ě-ěch pracě v-āk řd ětā celkem 125 druh ě (Brooke, 2004) nebo dokonce 137 druh ě (Onley *et Scofield*, 2007). Nāzory ř zných odborněk ě na p ět druh ś u jednotlivých ěledě se ř zně, navěc neně jasně, zda n které druhy nejsou pouze poddruhy. Podle Gill *et Donker* (2015) řtā ěle albatrosovitě (Diomedidae) 21622 druh ě, ěle bu řakovětě

(Procellariidae) zahrnuje 80685 druhů, počet druhů v řádu kvočků (Hydrobatidae) je uváděn v rozmezí 23624 a řád kvočků (Pelecanoididae) zahrnuje 1 rod (Pelecanoides) se 4 druhy. (Gill *et Donker*, 2015)

Řád trubkonosí je monofyletická skupina a je sesterskou skupinou řádu tučáků (Sphenisciformes). (Hackett *et al.*, 2008)

3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity, nebo také krátké tandemové repetice (STRs) nebo jednoduché tandemové repetice (SSRs) jsou jedním z nejpoužívanějších molekulárních markerů. Jsou tvořeny opakováním 1–6 nukleotidů (Oliveira *et al.*, 2006) a nacházejí se v kódujících i nekódujících regionech genomu (Zane *et al.*, 2002). Výhody mikrosatelitů jako molekulárních markerů spoívají v jejich kodominanci, velkém počtu alel a také v tom, že vykazují výrazný délkový polymorfismus. Mikrosatelity se vyskytují v prokaryotických i eukaryotických buňkách. (Oliveira *et al.*, 2006)

Převod mikrosatelitových lokusů je stále předmětem zkoumání. Anmarkrud *et al.* (2008) ve své studii analyzovali vysoce polymorfní mikrosatelitový lokus u ptáka, HrU10, který se skládá z pentanukleotidových repetití. Zkoumali jeho evoluční historii a zjistili, že nejčastějšími mutacemi jsou ztráta nebo získání 1–2 jednotek repetice a nejpravděpodobnějším mechanismem vzniku těchto mutací je sklouznutí DNA polymerázy při replikaci. Zjistili také, že čím delší je repetice, tím je vyšší pravděpodobnost další mutace a také inserce jiné sekvence do repetice. (Anmarkrud *et al.*, 2008)

Existuje více druhů repetitivních sekvencí. Dělí se na dokonalé repetice, u kterých repetice není přerušena jinými sekvencemi, dále na nedokonalé repetice, kde je vmezen jeden nukleotid mezi repeticemi. Dalším druhem jsou přerušované repetice, kde se nachází jiná krátká sekvence mezi repeticemi, a nakonec to jsou složené repetice, kde se opakují dvě různé repetitivní sekvence za sebou. (Oliveira *et al.*, 2006)

Guichoux *et al.* (2011) ve svém článku srovnal dva druhy molekulárních markerů – mikrosatelity a markery založené na jednonukleotidových polymorfismech (SNPs). Mikrosatelity mají oproti SNPs vyšší alelovou diverzitu a mohou být použity pro *cross-species* PCR amplifikaci, protože jsou snadno aplikovatelné na blízce příbuzné druhy. Mikrosatelitové lokusy vykazují mnohem vyšší mutační rychlost než SNPs, jsou proto používány ke zkoumání souvisejících populací. Jejich negativem je dlouhá a nákladná

fáze hledání. Další nevýhodou je nutnost v těchto populačních vzorkách pro zjištění alelových etností. SNPs jsou vhodným markerem pro zkoumání dlouhodobé historie populace i druhu. (Guichoux *et al.*, 2011)

Hlavním negativem mikrosatelitů je nutnost jejich izolace *de novo* pro druhy, které jsou zkoumány poprvé. Repetitivní sekvence se totiž v těmto nacházejí v nekódujících regionech genomu, ve kterých dochází k mutacím i tam, kde nejsou v kódovaných místech. Klasický postup izolace mikrosatelitových lokusů spočívá v provedení genomových knihoven zkoumaného druhu. DNA je rozřezána a jednotlivé fragmenty jsou vložené do vektoru. Označená sonda hybridizuje s místem výskytu mikrosatelitů a detekují se pozitivní klony. Tento přístup je však efektivní pouze u druhů s vysokou frekvencí mikrosatelitů v genomu. Byly vyvinuty další metody, u kterých není potřeba konstrukce genomové knihovny, jsou však zatím málo používány. Další přístup používá knihovny, které jsou obohaceny o sekvence mikrosatelitů, hlavně dinukleotidů. Dojde ke konstrukci klasické genomové knihovny a posléze k získání jednostranné DNA (ssDNA). Ta se stane templátem pro prodloužení primeru, jako primer zde slouží dinukleotidová repetice. (Zane *et al.*, 2002)

Při amplifikaci mikrosatelitových lokusů může dojít k mnoha problémům, nejzávažnějším z nich je přítomnost tzv. nulových alel. Van Treuren (1998) zkoumal populační strukturu ústní níka velkého (*Haematopus ostralegus*) v Schiermonnikoog a pro jeden zkoumaný mikrosatelitový lokus (20H7) byl zjištěn výrazný nedostatek heterozygotů. Tento jev byl způsoben přítomností nulových alel, kdy nedochází k amplifikaci lokusu a to z důvodu variability v DNA v místech nasedání primeru. U heterozygota tedy vůbec nedojde k amplifikaci na lokusu jedné z alel, může se proto jevit jako homozygot. U homozygota pro nulovou alelu k amplifikaci nedojde ani u jedné alely. (Van Treuren, 1998)

V posledních letech se používání mikrosatelitů stává levnějším a rychlejším, a to zejména díky snížení ceny genotypování a využití sekvenčních metod nové generace. Tyto metody umožnily identifikaci velkého počtu mikrosatelitových lokusů u mnoha různých druhů živočichů, rostlin a hub, a to i těch nemodelových. Navíc dochází k přísunu nových selekcí vhodných mikrosatelitových lokusů. Dalším pokrokem je vylepšení metody multiplexové PCR, protože může docházet k amplifikaci více mikrosatelitových lokusů v jedné PCR reakci. Analýza mikrosatelitových lokusů má své uplatnění v analýze rodičovství, genomovém mapování a zkoumání populačních struktur (Guichoux

et al., 2011). Hlavními odvětvími, která využívají mikrosatelitové markery jsou konzervace genetiky a populační genetiky, zkoumanými jevy v populacích mohou být genový tok a drift. (Oliveira *et al.*, 2006)

3.4 *Cross-species* mikrosatelity

Jelikož je vývoj nových druhů specifických mikrosatelitových lokusů zdoluhavý a finančně nákladný, vyžadují molekulární a evoluční biologové molekulární markery, které jsou přenositelné mezi různými druhy. Genom ptáka obsahuje malý počet mikrosatelitových sekvencí ve srovnání například s člověkem. Mikrosatelity se tak lépe detekují, a proto u ptáka probíhá *cross-species* PCR amplifikace v t-ince úspěšně. Z tohoto důvodu je metoda *cross-species* PCR amplifikace u ptáka často používána. Galbusera *et al.* (2000) ve své studii *cross-species* PCR amplifikace u pvc potvrdili, že pravděpodobnost amplifikace a polymorfismu lokusů klesá se zvětšující se fylogenetickou vzdáleností jednotlivých druhů. Dalším závěrem jejich práce bylo, že nejvyšší míru polymorfismu vykazují ty primery, které se amplifikovaly u velkého počtu různých druhů. (Galbusera *et al.*, 2000)

Primmer *et al.* (2005) hledali faktory ovlivňující *cross-species* PCR amplifikaci mezi různými druhy ptáka. Potvrdili uhl známou skutečnost, že úspěšnost amplifikace souvisí s fylogenetickou vzdáleností zdrojového a cílového druhu. Také objevili, že čím je vyšší počet repetitivních jednotek mikrosatelitu u zdrojového druhu, tím více cílových druhů vykazuje polymorfismus v daném lokusu. Naopak se ukázalo, že repetitivní motiv (počet nukleotidů v repetici) ani struktura repetitivní sekvence úspěšnost amplifikace nijak neovlivňuje. Dalším poznatkem bylo, že důležitým faktorem je teplota nasedání primerů při PCR reakci. Čím je teplota annealingu nižší, tím je vyšší pravděpodobnost amplifikace mikrosatelitového lokusu. (Primmer *et al.*, 2005)

Barbarà *et al.* (2007) porovnávali přenositelnost mikrosatelitových lokusů u t-ince u flivořích, rostlin a hub. Přenositelnost je nejvyšší u flivořích, u rostlin je značně variabilní. Amplifikace mikrosatelitových lokusů byla tím úspěšnější, čím byl zdrojový organismus příbuznější cílovému, tudíž nejvyšší pravděpodobnost amplifikace byla mezi jednotlivými druhy téhož rodu. Nejvyšší procento amplifikace bylo pozorováno u druhů s dlouhou generační dobou, u kterých nedochází k příbuzenskému křížení. Úspěšnost amplifikace také souvisí s velikostí genomu o velikost genomu cílových

organism by m la být malá v porovnání s velikostí genomu zdrojového organismu. (Barbarà *et al.*, 2007)

3.5 Mikrosatelity popsané u druh z ádu trubkonosí

Bylo popsáno celkem 207 mikrosatelitových lokus pro ád trubkonosí. Lokusy byly nalezeny u 17 druh ze t íeledí ó 53 mikrosatelitových lokus u zástupceeledi albatrosovití (Diomedeidae), dal-ích 100 mikrosatelitových lokus bylo popsáno u druh zeledi bu ákovití (Procellariidae) a u druheledi bu ákovití (Hydrobatidae) bylo popsáno 54 mikrosatelitových lokus. Pro zástupceeledi bu níkovití (Pelecanoididae) nebyly zatím popsány žádné mikrosatelitové lokusy.

Pro popula ní studie trubkonosých jsou vyufflvány i mikrosatelitové lokusy popsané u jiných druh pták z dal-ích ád. Kritériem pro pouffití takových mikrosatelit je, aby vykazovaly polymorfismus u druh z ádu trubkonosí. Toto kritérium spl ují například n které mikrosatelitové lokusy popsané u druh kulík mo ský (*Charadrius alexandrius*) z ádu dlouhok ídlí (Charadriiformes),eledi kulíkovití (Charadriidae) a racek novozélandský (*Larus novahollandiae scopulinus*) téff z ádu dlouhok ídlí (Charadriiformes),eledi rackovití (Laridae) a les á ek flutý (*Dendroica petechia*) z ádu p vci (Passeriformes),eledi les á kovití (Parulidae).

3.5.1 Mikrosatelity popsané u druh zeledi albatrosovití

V sou asné době existuje 53 polymorfních mikrosatelitových lokus popsaných u 5 druh zeledi albatrosovití (Diomedeidae). Lokusy pocházejí od jedině druh albatros st hovavý (*Diomedea exulans*), albatros malý (*D. chrysostoma*), albatros ernonohý (*Phoebastria nigripes*), albatros laysanský (*P. immutabilis*) a albatros b lobradý (*P. albatrus*). (Burg, 1999; Burg *et Croxall*, 2001; Burg *et Croxall*, 2004; Dubios *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 2014)

Burg (1999) charakterizovala 11 nových mikrosatelitových lokus u **albatrosa st hovavého** (*Diomedea exulans*) a 15 mikrosatelitových lokus u **albatrosa malého** (*D. chrysostoma*). Pro kafdý druh byly z izolované DNA jednoho jedině vytvo eny dv genomové knihovny, jedna z nich obohacená o repetice. Polymorfismus byl testován na 90 albatrosech st hovavých z 5 r zných skupin hnízdících na Adamsových ostrovech, Aucklandových ostrovech, Crozetových ostrovech, ostrovech Prince

Edwarda a z Jifní Georgie a na 50 albatrosech malých. Opakování dinukleotid tvoří lokusy De1, De2, De7, De12, Dc16, Dc19, Dc20, Dc21, Dc22, D24, Dc26 a Dc27. Lokus D32 je tvořen opakováním trinukleotid. De3, De17 a De18 jsou p-eručné mikrosatelitové lokusy a ostatní mikrosatelitové lokusy jsou komplexní složené repetice. Počet alel u jednotlivých mikrosatelitů je 2611. Byla provedena *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů pocházejících od albatrosa st. hovavého na albatrosu malém, a také *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů pocházejících od albatrosa malého na albatrosu st. hovavém. Navíc byla provedena *cross-species* PCR amplifikace všech mikrosatelitů u 50 jedinců druhu albatros černobrvý (*D. melanophrys*). Počet alel u polymorfních lokusů se pohyboval v rozmezí 2610. Nedošlo k amplifikaci lokusů Dc10 a Dc19 u albatrosa st. hovavého. (Burg, 1999)

Burg *et* Croxall (2001) zkoumali populační strukturu albatrosů edohlavých (*Thalassarche chrysostoma*), albatrosů černobrvých (*T. melanophrys*) a albatrosa campbellského (*T. impavida*). Použili k tomu analýzu mitochondriální DNA a mikrosatelitových lokusů. Autoři použili mikrosatelity Dc5, Dc9, De11, Dc21, Dc22, Dc27 a nově popsaný mikrosatelitový lokus De35, který byl popsán u **albatrosa st. hovavého** (*D. exulans*). *Cross-species* PCR amplifikace všech mikrosatelitových lokusů byla provedena u 765 albatrosů černobrvých, u kterých měl lokus De35 7612 alel pro 5 různých populací a u 756 albatrosů edohlavých, u kterých se počet alel pro mikrosatelitový lokus De35 pohyboval v rozmezí 8622 pro 5 různých populací. (Burg *et* Croxall, 2001)

Nově popsaný mikrosatelitový lokus De37, který byl popsán u **albatrosa st. hovavého** (*D. exulans*), byl použit při zkoumání populační struktury tohoto druhu a také dalších druhů, u kterých byly zkoumány také fylogenetické vztahy. Pro nalezení mikrosatelitového lokusu a zkoumání variability byla použita DNA jedinců z ostrovů Protinofc, Campbellových ostrovů, Adamsových ostrovů, Crozetových ostrovů, ostrova Marion, Jifní Georgie, ostrova Prince Edwarda a ostrova Tristan da Cunha. Bylo detekováno 6 alel pro daný mikrosatelitový lokus u albatrosa st. hovavého. *Cross-species* PCR amplifikace byla provedena u dalších druhů, které byly dříve považovány za poddruhy albatrosa st. hovavého, a to u albatrosa Gibsonova (*D. gibsoni*), u kterého bylo detekováno 6 alel pro lokus De37 a u albatrosa jifního (*D. antipodensis*), u kterého bylo detekováno 7 alel pro lokus De37. (Burg *et* Croxall, 2004)

Dubios *et al.* (2005) popsali 10 nových polymorfních lokusů u **albatrosa st. hovavého** (*D. exulans*). Pro nalezení mikrosatelitů byla použita DNA ze vzorku,

který byl odebrán jedinci z Pointe Morne na Kerguelenových ostrovech. Variabilita byla zkoumána u 3 populací, dvou z Crozetových ostrovů a jedné z Kerguelenových ostrovů, každá populace se skládala z 20 jedinců. Lokusy 7D8, 11H7 a 12E1 jsou opakující se dinukleotidy, lokus 12C8 je nedokonalá repetice (mezi repetice je vmezen jeden nukleotid), repetice lokusu 6F12 jsou perynými dinukleotidem a ostatní lokusy jsou tvořeny komplexními složenými repeticemi. Počet alel se pohyboval v rozmezí od 2 do 13. Populace byly v Hardy-Weinbergovské rovnováze. Mikrosatelity byly použity pro *cross-species* PCR amplifikaci u dalších druhů z řádu trubkonosů z čeledi buřákovití (Procellariidae), a to u buřáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*). Celkem 5 lokusů se ukázalo jako polymorfní (6A3, 12H8, 10C5, 11H7 a 12C8). Dále u buřáka sněžného (*Pagodroma nivea*), kde byly jako polymorfní vyhodnoceny 3 lokusy (12H8, 10C5 a 12C8) a u buřáka bělého (*Calonectris diomedea*), u kterého byly všechny lokusy monomorfní. Lokusy 6F12 a 7D8 se u těchto druhů neamplifikovaly. (Dubios *et al.*, 2005)

Hernandez *et al.* (2014) popsali 15 nových mikrosatelitových lokusů u 3 druhů albatrosů: 5 u **albatrosa černonohého** (*Phoebastria nigripes*), 4 u **albatrosa laysanského** (*P. immutabilis*) a 6 u **albatrosa bobradého** (*P. albatrus*). Genomová knihovna byla vytvořena na základě DNA extrahované ze svalů 36 albatrosů černonohých (*P. nigripes*), 12 albatrosů laysanských (*P. immutabilis*) a 3 albatrosů bobradých (*P. albatrus*). Na stejných vzorcích byla testována variabilita, u albatrosa černonohého a albatrosa laysanského bylo 13 lokusů polymorfních, u albatrosa bobradého vykazovalo polymorfismus 14 lokusů. V těchto lokusů je tvořena dinukleotidy (BFAL20, BFAL4, STAL4, STAL12 a STAL8), repetice trinukleotid tvoří lokusy LAAL10 a STAL18 a zbylé lokusy jsou tvořeny tetranukleotidy (STAL24, LAAL19 a STAL20). U mikrosatelitů nalezených u albatrosa černonohého bylo detekováno 4618 alel, počet alel mikrosatelitových lokusů u albatrosa laysanského byl 4610 a u albatrosa bobradého bylo detekováno 265 alel. Populace byla v Hardy-Weinbergovské rovnováze. Při *cross-species* PCR amplifikaci všech mikrosatelitů u všech druhů bylo pro polymorfní lokusy, které se amplifikovaly, nalezeno 2614 alel. (Hernandez *et al.*, 2014)

3.5.2 Mikrosatelity popsané u druhů z čeledi buřákovití

Dalších 100 mikrosatelitových lokusů bylo popsáno u zástupců čeledi buřákovití (Procellariidae), a to u 9 druhů. Jsou to buřák trinidadský (*Pterodroma arminjoniana*), buřák havajský (*P. sandwichensis*), buřák taiko (*P. magentae*), buřák Bulwer v

(*Bulweria bulwerii*), bu ák baleárský (*P. mauretanicus*), bu ák sv tlenohý (*P. carneipes*), bu ák b lobradý (*Procellaria aequinoctialis*), bu ák –edý (*Calonectris diomedea*) a bu ák útlozobý (*Pachyptila belcheri*). (Techow et O’Ryan, 2004; Friesen et al., 2006; Bried et al., 2008; Lawrence, 2008; Brown et Jordan, 2009; Gonzalez et al., 2009; Andris et al., 2010; Welch et Fleischer, 2011; Hardesty et al., 2012; Quillfeldt et al., 2012)

Celkem 7 nových mikrosatelitových lokus charakterizovali Techow et O’Ryan (2004) u bu áka b lobradého (*Procellaria aequinoctialis*). Genomová knihovna byla vytvořena z DNA izolované z tkáně a byla obohacena o mikrosatelitové repetice a polymorfismus byl zjištěn u 68 jedinců z ostrovů Marion, Jifní Georgie a z Antipod. Z těchto lokusů je 5 tvořeno opakujícími se dinukleotidy (Paequ3, Paequ7, Paequ8, Paequ10 a Paequ13), dalších 2 lokusy jsou p–erované repetice. Celkem 6 lokusů bylo polymorfních u zdrojového druhu a počet alel u polymorfních lokusů byl v rozmezí 3–9. Jeden lokus (Paequ4) byl polymorfní u dalších dvou druhů trubkonosých u bu áka obrovského (*Macronectes giganteus*) a bu áka Hallova (*M. hallis*) z eledi bu ákovití (Procellariidae). Bu ák obrovský a bu ák Hall v vykazovali polymorfismus také u lokusů Paequ3, Paequ7 a Paequ10. Byla provedena *cross-species* PCR amplifikace u dalších 4 druhů trubkonosých. U bu áka tristanského (*Procellaria conspicillata*) z eledi bu ákovití (Procellariidae) byly všechny lokusy kromě Paequ4 polymorfní. U albatrosa černobřvého (*Thalassarche melanophris*) z eledi albatrosovití (Diomedidae) byly polymorfní lokusy Paequ2, Paequ3, Paequ10 a Paequ13. Stejně mikrosatelitové lokusy (a Paequ8) vykazovaly polymorfismus u albatrosa –edohlavého (*T. chrysostoma*) z eledi albatrosovití (Diomedidae), u albatrosa st hovávého (*Diomedea exulans*) ze stejné eledi byl polymorfní pouze lokus Paequ2, ostatní se neamplifikovaly. (Techow et O’Ryan, 2004)

Friesen et al. (2006) zkoumali genetické vztahy mezi 5 populacemi bu áka tmavoh betého (*Pterodroma phaeopygia*). Použili k tomu 6 mikrosatelitů Dc16, Paequ10, RBG18, RBG29, Dpu01 a Cco5-21. Variabilitu testovali na 206 jedincích z 5 ostrovů Galapáfského souostroví (Floriana, Santa Cruz, San Christóbal, Santiago a Isabela). Mikrosatelitový lokus Dc16 byl popsán u albatrosa malého (*Diomedea chrysostoma*) (Burg, 1999), lokus Paequ10 pochází ze zdrojového druhu bu ák b lobradý (*Procellaria aequinoctialis*) (Techow et O’Ryan, 2004). Mikrosatelity RBG18 a RBG29 byly popsány u racka novozélandského (*Larus novahollandiae*

scopulinus) (Given *et al.*, 2002). Mikrosatelit Dpμ01 byl popsán u lesáka flutého (*Dendroica petechia*) z řádu pěvců a je to lokus tvořený repetitivními dinukleotidy (Dawson *et al.*, 1997). Podrobné informace o lokusu Cco5-21 nebyly dosud publikovány, tento lokus pochází od zástupce rodu alkoun (*Cepphus*) z řádu dlouhokřídlých (Charadriiformes). Bylo nalezeno 2614 alel pro jednotlivé lokusy a populace. (Friesen *et al.*, 2006)

Bried *et al.* (2008) popsali 11 nových mikrosatelitů u buřáka ledového (*Calonectris diomedea*). Vzorek DNA pro vytvoření genomové knihovny byl odebrán jedinci z ostrova Vila, který se nachází v Azorském souostroví. Variabilita byla zkoumána u 43 jedinců z ostrova Vila. Mikrosatelitové lokusy Cd1, Cd2, Cd3, Cd5 a Cd7 jsou složené repetice a ostatní mikrosatelitové lokusy jsou tvořeny dinukleotidy. Lokus Cd4 byl označen jako pohlavně vázaný, protože z 23 samic nebyla ani jedna v daném lokusu heterozygotní. Mikrosatelitové lokusy měly 268 alel a populace byla v Hardy-Weinbergově rovnováze. Autoři provedli *cross-species* PCR amplifikaci u dalších 3 druhů trubkonosých ptáků u albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*) z řádu albatrosovití (Diomedea) a u buřáka ledového (*Procellaria aequinoctialis*) a buřáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) z řádu buřákovití (Procellariidae). Z testovaných mikrosatelitů byl Cd1 polymorfní u albatrosa stěhovavého (*D. exulans*), Cd2 a Cd9 byly polymorfní u buřáka ledového (*P. aequinoctialis*) a osm mikrosatelitů (Cd2, Cd3, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd10 a Cd11) bylo polymorfních u buřáka Bulwerova (*B. bulwerii*). Informace o počtech alel autoři v publikaci neuvádějí. (Bried *et al.*, 2008)

Celkem 2 nové mikrosatelity (Tch6 a Tch25) charakterizovala Lawrence (2008) ve své doktorské práci u buřáka taiko (*Pterodroma magentae*). Zkoumala populační strukturu a mimopárovou paternitu kolonie hnízdících na Chathamových ostrovech. Krevní vzorky pro izolaci DNA byly sebrány od 145 jedinců, u jednoho jedince byla DNA izolována z pera. Celkem 2 mikrosatelitové lokusy se ukázaly jako vhodné k testování mimopárové paternity. Oba lokusy (Tch6 a Tch25) se skládají z repetitivních dinukleotidů, u Tch6 byly nalezeny 2 alely, lokus Tch25 má celkem 4 alely. Autorka provedla *cross-species* PCR amplifikaci, při které poučila dalších 22 mikrosatelitových lokusů popsaných u jiných druhů ptáků. Celkem 6 z nich se ukázalo jako polymorfní. Paequ3, Paequ8 a Paequ13 popsané u buřáka ledového (Techow *et al.*, 2004), RBG18 a RBG29 popsané u racka novozélandského (Given *et al.*, 2002) a De33 popsaný u albatrosa stěhovavého (Burg, 1999). Bylo u nich detekováno 269 alel a tyto

lokusy byly také použity pro analýzu mimopárové paternity u buřáka taiko. (Lawrence, 2008)

Celkem 6 mikrosatelitových lokusů u **buřáka trinidadského** (*Pterodroma arminjoniana*) popsali Brown *et* Jordan (2009). DNA pro vývoj mikrosatelitů byla získána ze tří mrtvých mláďat z Kulatého ostrova a variabilita byla testována na 260 jedincích z Kulatého ostrova a 80 jedincích z Trinidadu. Lokusy Parm01 a Parm04 se skládají z opakujících se dinukleotidů, lokusy Parm01 a Parm02 jsou tvořeny p-eru-enou repeticí a zbylé lokusy jsou komplexně složené repetice. Tyto mikrosatelitové lokusy byly vyhodnoceny jako polymorfní u buřáka trinidadského (Parm01, Parm02 a Parm03) a bylo detekováno 369 alel pro dvě uvedené populace. Tyto další lokusy se ukázaly jako monomorfní. Autoři prováděli *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů u dalších 17 druhů trubkonosých a 1 druhu tuřáka. Lokus Parm04 byl polymorfní u buřáka bobradého (*Procellaria aequinoctialis*) z eledi buřákovití (Procellariidae) a u albatrosa černobřvého (*Thalassarche melanophrys*), u albatrosa bědohlavého (*T. chrysostoma*) a albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*) z eledi albatrosovití (Diomedea). Mikrosatelit Parm05 vykazoval polymorfismus u buřáka proměnlivého (*Pterodroma neglecta*), buřáka madeirského (*P. madeira*) a buřáka kapverdského (*P. feae*) z eledi buřákovití. Lokus Parm06 byl polymorfní u buřáka madeirského (*P. madeira*), buřáka kapverdského (*P. feae*), buřáka bědého (*Calonectris diomedea*) a buřáka holubího (*Pachyptila desolata*) z eledi buřákovití, u buřáka georgijského (*Pelecanoides georgicus*) z eledi buřákovití (Pelecanoides) a u albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*) z eledi albatrosovití. Polymorfní lokusy byly variabilní ve 264 alelách. Lokus Parm02 vykazoval odchylku od Hardy-Weinbergova zákona, nejspíše kvůli výskytu nulových alel. V dané studii byl pro *cross-species* PCR amplifikaci použit také mikrosatelitový lokus Calex01, který jsem použila ve své práci. Tento lokus charakterizovali Küpper *et al.* (2007) u kulíka mořského (*Charadrius alexandrius*) z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), eledi kulíkovití (Charadriidae). Lokus je tvořen komplexně složenou repeticí. Pro populaci z Kulatého ostrova byly detekovány 4 alely a pro populaci z Trinidadu byly nalezeny 3 alely. (Brown *et* Jordan, 2009)

Celkem 10 nových mikrosatelitových lokusů popsali Gonzalez *et al.* (2009) u **buřáka baleárského** (*Puffinus mauretanicus*). Byly vytvořeny 2 genomové knihovny z DNA izolované ze svalů a byly obohaceny o mikrosatelity. Polymorfismus byl zkoumán u 55 jedinců ze 2 lokalit na Baleárských ostrovech a 35 jedinců z Cabrery a

20 jedinc z Eivissie. Všechny lokusy jsou tvořeny dinukleotidovými repeticemi, kromě Puff Sma6, který tvoří oktanukleotidy. Lokus Puff Sma6 je lokalizován na pohlavním chromozomu W, protože se amplifikoval pouze u samic. Bylo detekováno 2610 alel na lokus a populace byla v Hardy-Weinbergovské rovnováze. Všechny polymorfní mikrosatelitové lokusy u buňka baleárského byly testovány u blízce příbuzného buňka stedomského (*P. yelkouan*), u kterého se všechny amplifikovaly a v tina z nich byla polymorfní, průměrná počet alel se pohyboval v rozmezí 269. Jako monomorfní byl označen pouze mikrosatelitový lokus Puff 62F. (Gonzalez *et al.*, 2009)

Andris *et al.* (2010) popsali 11 nových mikrosatelitů u **buňka Bulwerova** (*Bulweria bulwerii*). Z DNA získané z krevních vzorků byla vytvořena genomová knihovna a byla obohacena o mikrosatelity. Polymorfismus byl zkoumán u 91 dospělých z ostrova Vila, což je jedno z posledních míst hnízdní buňka Bulwerova. Všechny mikrosatelitové lokusy jsou tvořeny opakováním dinukleotidů. Mikrosatelit Bb11 byl vyhodnocen jako vázaný na pohlaví, protože se neprojevil polymorfni u žádného ze 44 jedinců samičího pohlaví. Bylo detekováno 268 alel na lokus. Populace byla v Hardy-Weinbergovské rovnováze. Polymorfní lokusy byly dále testovány na 3 druzích z řádu trubkonosí, a to na buňkovi modravém (*Halobaena caerulea*) z řádu buňkovití, u kterého bylo 10 lokusů polymorfních. Dále na buňkovi bobradém (*Procellaria aequinoctialis*) z řádu buňkovití, kde 6 mikrosatelitů vykazovalo polymorfismus a na buňkovi Monteirov (*Oceanodroma montei*) z řádu buňkovití (Hydrobatidae), u kterého bylo polymorfních 5 lokusů. (Andris *et al.*, 2010)

Welch *et al.* (2011) izolovali 10 nových mikrosatelitových lokusů u **buňka havajského** (*Pterodroma sandwichensis*). DNA použitá pro konstrukci genomové knihovny pochází od jedné samice a jednoho samce z Burkovy muzea ve Washingtonu. Primery byly testovány na 15 jedincích z Havajských ostrovů (ostrovy Hawaii, Maui, Lanai a Kauai), u kterých bylo nalezeno 3610 alel. Lokusy Ptero01, Ptero02, Ptero03 a Ptero04 jsou tvořeny dinukleotidy, lokusy Ptero06, Ptero07, Ptero08 a Ptero09 se skládají z opakování tetranukleotidů, lokus Ptero10 tvoří pentanukleotidy a lokus Ptero05 je peruená repetice. U lokusu Ptero06 byly pozorovány odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Welch *et al.* (2011) dále provedli *cross-species* PCR amplifikaci při které použili mikrosatelity popsané u jiných druhů z řádu trubkonosí, a to Parm01, Parm02, Parm03 a Parm05 popsané u buňka trinidadského (Brown *et al.*, 2009), Cd2 a Cd10 popsané u buňka -edého (Bried *et al.*, 2008), Puff PM2 popsaný u buňka baleárského (Gonzalez *et al.*, 2008) a Paequ3 popsaný u

buřka bledá (Techow *et al.* Ryan, 2004). Věchny lokusy vykazovaly polymorfismus a u buřka havajského bylo detekováno 3613 alel. Pro *cross-species* PCR amplifikaci byly dále použity dva mikrosatelitové lokusy RBG18 a RBG29, které popsali Given *et al.* (2002) u racka novozélandského (*Larus novahollandiae scopulinus*) z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes). Lokus RBG18 měl u buřka havajského 5 alel a pro lokus RBG29 bylo detekováno 14 alel. (Welch *et al.* Fleischer, 2011)

Hardesty *et al.* (2012) popsali 11 nových mikrosatelitových lokusů u **buřky tlenohébo** (*Puffinus carneipes*). DNA pro konstrukci genomové knihovny byla izolována z krve jednoho jedince. Polymorfismus byl testován na 84 jedincích, 46 jedinců pocházelo z hnízdní kolonie na ostrov Lorda Howa, 20 ptáků pocházelo z Nového Zélandu, 5 ze západní Austrálie a zbylých 13 mělo neznámý původ. Repetice v lokusech Pc A105, Pc A107 a Pc A115 jsou tvořeny dinukleotidy, Pc B11, Pc D3 a Pc D103 jsou tvořeny složenými repeticemi, Pc B115 se skládá z periodické repetice, mikrosatelitové lokusy Pc B109 a Pc C104 tvoří opakující se trinukleotidy a ostatní lokusy (Pc D109 a Pc D121) jsou tvořeny tetranukleotidy. Jednotlivé lokusy měly 3613 alel. (Hardesty *et al.*, 2012)

Quillfeldt *et al.* (2012) zkoumali mimopárovou paternitu u **buřky útlozobého** (*Pachyptila belcheri*) a popsali 7 nových mikrosatelitových lokusů. Z DNA jednoho jedince vytvořili genomovou knihovnu. Pro zkoumání variability odebrali genomickou DNA z vzorků kůže od 25 dospělých jedinců a z vzorků krve od 43 dospělých a 34 mláďat. Věchny mikrosatelity jsou tvořeny repeticemi tetranukleotidů. Mikrosatelity Patbel2 a Patbel5 se ukázaly jako nevhodné pro analýzu paternity. Lokus Patbel2 měl sice 16 alel, které však měly podobnou délku, což by mohlo vést k chybám v analýze. Patbel5 se nacházel na chromozomu Z. Počet alel u ostatních lokusů se pohyboval v rozmezí 5610. (Quillfeldt *et al.*, 2012)

Moodley *et al.* (2015) popsali 26 polymorfních mikrosatelitových lokusů u **buřky útlozobého** (*Pachyptila belcheri*). Obohacenou genomovou knihovnu vytvořili z DNA, kterou izolovali z krve dvou jedinců z ostrova Mayes a z Kerguelenových ostrovů. Variabilitu testovali na 77 buřkách útlozobých a na 79 blízce příbuzných buřkách holubích (*P. desolata*). Věchny mikrosatelitové lokusy jsou tvořeny dinukleotidy, pouze Pacbel10895 je tvořen složenou repeticí. Lokus Pacbel00829 byl vyřazen z další analýzy, protože byl ve vazbě s lokusy Pacbel03731 a Pacbel08509. Tyto dva lokusy ve vzájemné vazbě nebyly. Pro oba testované druhy bylo nalezeno 5648 alel. Autoři dále testovali hypotézu, že počet amplifikujících se lokusů se

snífluje s genetickou vzdáleností. Provedli *cross-species* PCR amplifikaci u 4 druhů zeledi buňákovití (Procellariidae) o u 118 jedinců buňáka širokozobého (*P. vittata*), u 18 buňák Salvinových (*P. salvini*), u 35 zástupců buňáka hrdličního (*P. turtur*) a u 99 buňák modravých (*Halobaena caerulea*). Dále byla provedena *cross-species* PCR amplifikace u 1 druhu zeledi buňákovití (Hydrobatidae) o u 6 buňák oceánských (*Oceanites oceanicus*). V třinácti mikrosatelitových lokusech se amplifikovala úspěšně u zástupců zeledi buňákovití, avšak jen třináct lokusů se amplifikovalo u zástupců zeledi buňákovití. Počet alel u polymorfních lokusů se pohyboval v rozmezí 2–69. (Moodley *et al.*, 2015)

3.5.3 Mikrosatelity popsané u druhů zeledi buňákovití

U třinácti zeledi, buňákovití (Hydrobatidae), bylo popsáno 54 mikrosatelitových lokusů, a to u 3 druhů. Jsou to buňáček madeirský (*Oceanodroma castro*), buňáček dlouhokřídlý (*O. leucorhoa*) a buňáček Monteirův (*O. monteiroi*). (Sun *et al.*, 2009; Bicknell *et al.*, 2011; Bried *et al.*, 2012)

Sun *et al.* (2009) popsali 9 nových mikrosatelitových lokusů u **buňáka madeirského** (*O. castro*). DNA pro tvorbu genomové knihovny buňáka byla izolována ze zmražených vzorků od 7 jedinců z Japonska. Variabilita byla testována na 27 buňáčích madeirských z Azorských ostrovů. Všechny lokusy jsou tvořeny opakováním dinukleotidů, kromě Oc79-2, který je složen z repetitivních trinukleotidů. Lokus Oc49 byl monomorfní, vykazoval však polymorfismus u dalších testovaných druhů. U polymorfních lokusů bylo detekováno 3–611 alel. *Cross-species* PCR amplifikace byla prováděna u 22 jedinců druhu buňáček Monteirův (*O. monteiroi*) z Azorských ostrovů a u 24 buňák dlouhokřídlých (*O. leucorhoa*) z Norska. Celkem 6 mikrosatelitových lokusů vykazovalo polymorfismus u všech testovaných druhů, tyto polymorfní lokusy měly 2–69 alel a populace byly v Hardy-Weinbergově rovnováze. Sun *et al.* (2009) dále charakterizovali 1 nový mikrosatelitový lokus u **buňáka dlouhokřídlého** (*O. leucorhoa*). DNA pro tvorbu genomové knihovny byla izolována ze zmražených vzorků od 2 jedinců z Newfoundlandu. Variabilita byla testována na 24 jedincích z Norska. Mikrosatelitový lokus OI10-39 je tvořen dinukleotidy a byly pro něj detekovány 3 alely. *Cross-species* PCR amplifikace byla provedena u 27 jedinců druhu buňáček madeirský (*O. castro*) a u 22 jedinců druhu buňáček Monteirův (*O. monteiroi*). U každého z těchto druhů bylo pro daný lokus detekováno 8 alel. (Sun *et al.*, 2009)

Bicknell *et al.* (2011) zjišovali umístění 41 polymorfních mikrosatelitových lokusů na chromozomech **buřáka dlouhokřídlého** (*O. leucorhoa*), z nichž 26 charakterizovali jako nové. Genomová knihovna byla vytvořena z DNA izolované z jednoho samce ze St. Kildy ve Skotsku a variabilita byla zkoumána na 24 jedincích (14 samců a 10 samic) z populace na ostrov Gill v Newfoundlandu. Lokusy Ole04 a Ole05 tvoří opakování pentanukleotidů, lokusy Ole01, Ole02, Ole03, Ole06 a Ole24 jsou tvořeny repeticemi tetranukleotidů, mikrosatelity Ole17 a Ole19 jsou tvořeny perynózními repeticemi, lokusy Ole12, Ole20, Ole21 a Ole25 jsou složené repetice a ostatní mikrosatelity tvoří opakování dinukleotidů. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 22, při čemž lokus Ole21 vykazoval vysokou hladinu polymorfismu s 22 alelami. Celkem 4 mikrosatelitové lokusy se nacházely na Z chromozomu, jsou tedy pohlavně vázané. Dva lokusy se odchylovaly od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. (Bicknell *et al.*, 2011)

Celkem 18 nových mikrosatelitových lokusů u **buřáka Monteirova** (*O. monteiroi*) popsali Bried *et al.* (2012). Genomová knihovna byla vytvořena z DNA izolované z jedince z ostrova Praia. Autoři testovali polymorfismus na 125 dospělých jedincích z ostrova Praia (65 samic a 60 samců) a detekovali 4617 alel na lokus. Lokusy jsou tvořeny repeticemi dinukleotidů (celkem 5 lokusů), trinukleotidů (celkem 3 lokusy), tetranukleotidů (celkem 3 lokusy) a 7 lokusů tvoří složené repetice. Mikrosatelitový lokus Omn23 byl vyhodnocen jako pohlavně vázaný, protože u samic nebyla v tomto lokusu heterozygotní. Populace byla v Hardy-Weinbergově rovnováze. Byla provedena *cross-species* PCR amplifikace u dalších 3 druhů trubkonosých šků u nejpodobnějšího buřáka madeirského (*O. castro*) z řádu buřákovitých (Hydrobatidae) bylo 17 lokusů polymorfních, u buřáka modravého (*Halobaena caerulea*) z řádu buřákovitých (Procellariidae) vykazovaly polymorfismus 2 lokusy a u buřáka Bulwerova (*B. bulwerii*) z řádu buřákovitých byly polymorfní 3 lokusy. (Bried *et al.*, 2012)

4. Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Genomická DNA nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) pochází od 6 jedinců z chovu v ZOO Zlín-Ležná. Vedoucí práce provedl izolaci DNA z krve fenol-chloroformovou metodou s předpůsobením proteinázy K a DNA na edil tak, aby výsledná koncentrace byla 10-20 mg/ml.

4.2 Mikrosatelity amplifikované u nesyta indomalajského

Pro PCR amplifikaci jsem použil celkem 265 mikrosatelitových lokusů, které byly popsány u druhů pocházejících převážně ze 3 řádů trubkonosí (Procellariiformes), a od 4 druhů z jiných řádů dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pvcí (Passeriiformes). Většina mikrosatelitových lokusů byla polymorfních u zdrojového druhu, některé byly u zdrojového druhu monomorfní, ale vykazovaly polymorfismus u blízkých příbuzných druhů. Je to například lokus Paequ4, který byl popsán pro buňka b lohradého (*Procellaria aequinoctialis*), ale vykazoval polymorfismus u buňka obrovského (*Macronestes giganteus*) a buňka Hallova (*M. hallis*) z řádu buňkovití. Dále jsou to mikrosatelitové lokusy Parm04, Parm05 a Parm06, které byly popsány u buňka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*), u tohoto druhu však byly vyhodnoceny jako monomorfní. Lokus Parm04 byl polymorfní u buňka b lohradého (*P. aequinoctialis*) z řádu buňkovití a u albatrosa černobřevého (*Thalassarche melanophris*), albatrosa bědohlavého (*T. chrysostoma*) a albatrosa st hovávého (*Diomedea exulans*) z řádu albatrosovití. Lokus Parm05 vykazoval polymorfismus u buňka proměnlivého (*Pterodroma neglecta*), buňka madeirského (*P. madeira*) a buňka kapverdského (*P. feae*) z řádu buňkovití. Mikrosatelitový lokus Parm06 byl polymorfní u buňka madeirského (*P. madeira*), buňka kapverdského (*P. feae*), buňka bědého (*Calonectris diomedea*) a buňka holubího (*Pachyptila desolata*) z řádu buňkovití, u buňka georgijského (*Pelecanoides georgicus*) z řádu buňkovití a u albatrosa st hovávého (*D. exulans*) z řádu albatrosovití. Dalším takovým lokusem je Oc49, který byl popsán u buňka madeirského (*Oceanodroma castro*), u kterého byl monomorfní. Vykazoval však polymorfismus u buňka Monteirova (*O. monteiroi*) a buňka dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*) z řádu buňkovití. Použití mikrosatelitové lokusy popsané u zástupců řádu trubkonosí jsem

uvedla v tabulce . 1. Mikrosatelitové lokusy, které byly popsány u zástupců jiných druhů, jsou uvedeny v tabulce . 2.

Tabulka . 1 : Mikrosatelity popsané u druhů řádu trubkonosí.

ele	Zdrojový druh	Testované mikrosatelity	Autor článku
Albatrosovití (Diomedae)	Albatros střelohavý (<i>Diomedea exulans</i>)	De1, De2, De3, De7, De11, De12, De17, De18, De25, De30, De33	Burg (1999)
		De35	Burg <i>et</i> Croxall (2001)
		De37	Burg <i>et</i> Croxall (2004)
		7D8, 12C8, 11H7, 10C5, 12H8, 6A3, 11H1, 11F3, 6F12, 12E1	Dubois <i>et al.</i> (2005)
	Albatros malý (<i>Diomedea chrysostoma</i>)	Dc5, D6, Dc9, Dc10, Dc16, Dc19, Dc20, Dc21, Dc22, D24, Dc26, Dc27, D29, Dc31, D32	Burg (1999)
	Albatros ernonohý (<i>Phoebastria nigripes</i>)	BFAL11, BFAL14, BFAL19, BFAL20, BFAL4	Hernandez <i>et al.</i> (2014)
	Albatros laysanský (<i>Phoebastria immutabilis</i>)	LAAL1, LAAL7, LAAL10, LAAL19	Hernandez <i>et al.</i> (2014)
Albatros bílálohý (<i>Phoebastria albatrus</i>)	STAL24, STAL18, STAL20, STAL4, STAL12, STAL8		
Buřákovití (Procellariidae)	Buřák bílálohý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	Paequ2, Paequ3, Paequ4, Paequ7, Paequ8, Paequ10, Paequ13	Techow <i>et</i> O'Ryan (2004)
	Buřák -edý (<i>Calonectris diomedea</i>)	Cd1, Cd2, Cd3, Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd10, Cd11	Bried <i>et al.</i> (2008)
	Buřák taiko (<i>Pterodroma magentae</i>)	Tch6, Tch25	Lawrence (2008)

Tabulka . 1 : Mikrosatelity popsané u druhů řádu trubkonosí ó pokračování 1.

ele	Zdrojový druh	Testované mikrosatelity	Autor článku
Buřákovití (Procellariidae)	Buřák trinidadský (<i>Pterodroma arminjoniana</i>)	Parm01, Parm02, Parm03, Parm04, Parm05, Parm06	Brown <i>et al.</i> (2009)
	Buřák baleárský (<i>Puffinus mauretanicus</i>)	Puff1.5, Puff1.9, Puff4B, PuffC5A, PuffC5D, Puff62C, Puff62F Puff611F, Puff PM2, Puff Sma6	Gonzalez <i>et al.</i> (2009)
	Buřák holubí (<i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb2, Bb3, Bb7, Bb10, Bb11, Bb12, Bb20, Bb21, Bb22, Bb23, Bb25	Andris <i>et al.</i> (2010)
	Buřák havajský (<i>Pterodroma sandwichensis</i>)	Ptero01, Ptero02, Ptero03, Ptero04, Ptero05, Ptero06, Ptero07, Ptero08, Ptero09, Ptero10	Welch <i>et al.</i> (2011)
	Buřák sv. tlenohý (<i>Puffinus carneipes</i>)	PcA105, PcA107, PcA115, PcB11, PcB109, PcB115, PcD104, PcD3, PcD103, PcD109, PcD121	Hardesty <i>et al.</i> (2012)
	Buřák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	Patbel1, Patbel2, Patbel3, Patbel4, Patbel5, Patbel6, Patbel7	Quillfeldt <i>et al.</i> (2012)
Pacbel00386, Pacbel02653, Pacbel03731, Pacbel04240, Pacbel04355, Pacbel04991, Pacbel07265, Pacbel08509, Pacbel08867, Pacbel08988, Pacbel09021, Pacbel09528, Pacbel09957, Pacbel10033, Pacbel10895, Pacbel12344, Pacbel15293, Pacbel15327, Pacbel16671, Pacbel16989, Pacbel17529, Pacbel17944, Pacbel17986, Pacbel19907, Pacbel20784		Moodley <i>et al.</i> (2015)	

Tabulka . 1 : Mikrosatelity popsané u druhů řádu trubkonosí o pokračování 2.

ele	Zdrojový druh	Testované mikrosatelity	Autor článku
Buňákovití (Hydrobatidae)	Buňáček madeirský (<i>Oceanodroma castro</i>)	Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B	Sun <i>et al.</i> (2009)
	Buňáček dlouhokřídlý (<i>Oceanodroma leucorhoa</i>)	OI10-39	Sun <i>et al.</i> (2009)
		Ole01, Ole02, Ole03, Ole04, Ole05, Ole06, Ole07, Ole08, Ole09, Ole10, Ole11, Ole12, Ole13, Ole14, Ole15, Ole16, Ole17, Ole18, Ole19, Ole20, Ole21, Ole22, Ole23, Ole24, Ole25, Ole26	Bicknell <i>et al.</i> (2011)
	Buňáček bledý (<i>Pelagodroma marina</i>)	Pema1, Pema2, Pema3, Pema4, Pema5, Pema6, Pema7, Pema8, Pema9, Pema10, Pema11, Pema12, Pema13, Pema14	Silva <i>et al.</i> (2011)
	Buňáček Monteirova (<i>Oceanodroma monteiroi</i>)	Omn1, Omn2, Omn3, Omn4, Omn6, Omn7, Omn8, Omn11, Omn14, Omn15, Omn16, Omn17, Omn21, Omn22, Omn23, Omn24, Omn25, Omn28	Bried <i>et al.</i> (2012)

Tabulka . 2 : Polymorfní mikrosatelitové lokusy odvozené od druh z dal-ích ád .

ád	ele	Zdrojový druh	Testované mikrosatelity	Autor lánku
Dlouhok ídlí (Charadriiformes)	Kulíkovití (Charadriidae)	Kulík mo ský (<i>Charadrius alexandrius</i>)	Calex01	Küpper <i>et al.</i> (2007) Brown <i>et Jordan</i> (2009)
	Rackovití (Laridae)	Racek novozélandský (<i>Larus novahollandiae scopulinus</i>)	RBG18, RBG29	Given <i>et al.</i> (2002) Welch <i>et Fleischer</i> (2011)
	Alkovití (Alcidae)	Alkoun (<i>Cephus spp.</i>)	Cco5-21	Friesen <i>et al.</i> (2006)
P vci (Passeriformes)	Les á kovití (Parulidae)	Les á ek flutý (<i>Dendroica petechia</i>)	Dpμ01	Dawson <i>et al.</i> (1997) Friesen <i>et al.</i> (2006)

4.2.1 PCR amplifikace

P ipravila jsem si reak ní sm s, a to postupným napipetováním v-ech reagentů do 1,5ml zkumavky podle tabulky . 3. Obsah zkumavky jsem poté odst edila na centrifuze a zvortexovala. Do 6 mikrozkuvek o objemu 0,2 ml jsem pipetovala po 1 μl DNA izolované od 6 r zných jedinc nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Do každé mikrozkuvky jsem poté p idala 9 μl p ipravené reak ní sm si. P i výskytu nadbyte ných stutter band ů u n kterých mikrosatelit jsem do PCR reakce pipetovala polovi ní objem (2 μl) roztoku MgCl₂, aby byla v premixu polovi ní koncentrace Mg²⁺.

Tabulka . 3 : Složení reakční směsi pro PCR reakci (pro 6 vzorků).

Reagencie	Pipetovaný objem [μl]
Deionizovaná voda	44,4
Reaction buffer 10x	6,7
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (20 μmol/l)	0,7
Primer F (10 μmol/l)	3,3
Primer R (10 μmol/l)	3,3
<i>Taq</i> DNA polymeráza (5 U/μl)	1,0

Zkumavky jsem umístila do termocykléru a nechala jsem probíhat PCR reakci, její průběh je popsán v tabulce .4.

Tabulka . 4 : Průběh PCR reakce

část cyklu	Teplota [°C]	čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	94	5 min	1
Denaturace DNA	94	30 s	35
Nasedání primer (annealing)	50	30 s	
Prodloužení komplementárního řetězce DNA	72	30 s	
Závěrečné prodloužení DNA	72	7 min	1

Pro všechny mikrosatelity probíhala PCR reakce při teplotě nasedání primer 50 °C. Pokud neprobíhala amplifikace mikrosatelitu, byla teplota snižována až na 46 °C, a pokud nebyl zřetelný žádný produkt ani při této teplotě, byl mikrosatelit vyřazen z další analýzy. Pokud byl produkt patrně hodnotitelný, byla teplota nasedání primer naopak zvyšována, aby byla nalezena optimální teplota, při které byl výsledný produkt nejlépe hodnotitelný a u polymorfních mikrosatelit mohl být určen počet alel a genotypy všech 6 testovaných jedinců.

4.2.2 Elektroforetická separace PCR produktů

Pro elektroforetickou separaci PCR produktů jsem použila vyřezanou elektroforetickou komerční S2 Whatman Biometra. Déle jsem použila 6%

polyakrylamidový gel za denaturujících podmínek o tloušťce 0,4 mm a skla o rozměrech 330 x 390 mm a 330 x 420 mm.

Příprava polyakrylamidového gelu

Velké sklo jsem omyla deionizovanou vodou a osušila kartáčkem. Poté jsem sklo otřela dosucha a dvakrát ošetřila jednu plochu 96% ethanolem. Na ošetřenou plochu skla jsem nanasla odpuzovač vody na skla automobilů a rozetřela. Nechala jsem 5 minut a poté jsem ošetřenou plochu omyla deionizovanou vodou.

Malé sklo jsem umyla vodou a saponátem a osušila kartáčkem. Sklo jsem otřela a ošetřila dvakrát jednu plochu 96% ethanolem. Na ošetřenou plochu skla jsem nanasla molekulární lepidlo a nechala 5 minut zaschnout. Poté jsem tuto plochu skla ošetřila čtyřikrát 96% ethanolem.

Na velké sklo jsem umístila 2 spacery silné 0,4 mm. Na velké sklo se spacery jsem přiložila malé sklo, a to ošetřenou plochou směrem k velkému sklu. Skla jsem k sobě připevnila 4 klipsy.

Připravila jsem si polyakrylamidový gel, jednotlivé složky jsem promíchala a gel jsem nalila mezi skla. Když gel pokryl celou plochu skel, vsunula jsem mezi skla hřebíček rovnou stranou dovnitř a na toto místo jsem připevnila další 4 klipsy. Nechala jsem gel polymerizovat po dobu 1 hodiny.

Elektroforetická separace produktů

Po ztuhnutí gelu jsem odstranila klipsy a vnitřní plochy skel jsem důkladně omyla od polyakrylamidu a osušila. Skla jsem poté umístila do elektroforetické komůrky a dobře upevnila. Do anodového a katodového prostoru jsem nalila 0,5x TBE pufr. Vyjmula jsem hřebíček a prostor mezi skly jsem vyčistila od zbytků polyakrylamidu proudem pufru z injekční stříkačky.

Gel jsem nechala po dobu 30 minut nahřívát, aby měla teplotu mezi 50-60 °C. Připojila jsem komůrku ke zdroji stejnosměrného napětí, kde byly nastaveny hodnoty napětí a proudu (3000 V / 150 mA). Nastavila jsem hodnotu výkonu na 90 W.

Připravila jsem si vzorky, ve kterých probíhala PCR reakce. Do každé mikrozkušavky jsem přidala 5 µl nanášečů pufru. Podložku s mikrozkušavkami jsem umístila do termocykléru a nechala jsem denaturovat při teplotě 94 °C po dobu 3 min. Po denuraci jsem vzorky umístila do ledu, aby nedošlo k renaturaci DNA.

Po 30 minutách nahívání gelu jsem komrku odpojila od zdroje stejnosměrného napětí a prostor mezi skly jsem opět vyčistila proudem pufru z injekční stříkačky. Mezi skla jsem vsunula hřebíček, aby zoubky byly cca 1 mm hluboko v gelu. Pomocí osmikanálové pipety jsem nanasla jednotlivé vzorky do prostor mezi zoubky hřebíčku.

Připojila jsem komrku ke zdroji a změnila hodnotu výkonu na 70 W. Nechala jsem separovat po dobu 90 min.

Vizualizace DNA v gelu stříbrem

Po uplynutí doby separace jsem odpojila komrku od zdroje, vyjmula jsem skla a oddělila jsem je od sebe nožem.

Malé sklo s přilepeným gelem jsem umístila do fotomisky, do které jsem nalila fix/stop roztok. Fotomisku jsem nechala na této etapě po dobu 20 minut. Poté jsem fix/stop roztok nalila zpět do nádoby a sklo s gelem jsem promyla 4x deionizovanou vodou.

Fotomisku jsem vrátila na této etapě a sklo s gelem jsem zalila 1% roztokem HNO_3 . Sklo s gelem jsem v tomto roztoku nechala po dobu 4 min, poté jsem roztok vylila a sklo promyla opět 4x deionizovanou vodou.

Sklo s gelem jsem přemístila do další fotomisky, do které jsem nalila předem připravený 1% roztok dusičnanu stříbrného s přidáním formaldehydem. Nechala jsem opět po dobu 30 min. Poté jsem sklo s gelem umístila do fotomisky s deionizovanou vodou na dobu 5 s a poté jsem je přemístila do další fotomisky.

Připravila jsem si vývojku, kterou jsem nalila do fotomisky s gelem. Když byly viditelné hned do černé pruhy PCR produkt obarvené stříbrem a začalo vystupovat tmavé pozadí, zastavila jsem reakci přidáním fix/stop roztoku.

Sklo s gelem jsem nechala po dobu 2 min v deionizované vodě a nechala jsem je usušit v sušárně.

Gel byl vyhodnocen na negatoskopu, byly určeny polymorfní lokusy, po které alel jednotlivých lokusů a genotypy jedinců.

Elektroforetogram byl neskenován a sklo s gelem bylo ponecháno na několik hodin do roztoku NaOH. Gel se tím od skla odlepil a to mohlo být použito znovu.

4.3 Seznam použitých chemikálií

Akrylamid (AppliChem)

aTaq DNA-polymeráza (5 U/ μ l), M1241 (Promega)
Bromfenolová mod (Serva)
Deionizovaná voda
Deoxyribunukleosidtrifosfáty (každý 100 mmol/l)
Dusi nanostříbrný (Lachema)
Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachema)
Formaldehyd (Lachema)
Formamid (Lachema)
Hydroxid sodný (Lachema)
Chlorid sodný (Lachema)
Kyselina boritá (Lachema)
Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachema)
Kyselina octová - ledová (Lachema)
Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
Mocovina (Lachema)
N,N'-metylenbisakrylamid (AppliChem)
N,N,N',N'-tetrametylendiamin (TEMED) (Serva)
Peroxodisíran amonný (Serva)
Odpuzovač vody ze skel automobil Rain off (Sheron)
Thiosíran sodný (Lachema)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
Uhlíkatý sodný (Lachema)
Xylenová mod (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.4 Seznam použitých roztoků

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

380 g akrylamidu
20 g N,N'-metylenbisakrylamidu
rozpustit v 500 ml deionizované H_2O
objem doplnit na 1 l
roztok uložít v temné lahvi ve 4 °C

Zásobní roztok 6% akrylamidu:

420 g mo oviny

484 ml deionizované H₂O

50 ml 10 x TBE

150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N,N'- methylenbisakrylamid 19:1

po rozpu-t ní v-ech sloflek zfiltrvat a uloflit v temné lahvi ve 4 °C

Polyakrylamidový 6% gel:

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

400 l 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈

40 l N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu

Fix/stop roztok:

80 ml ledové kyseliny octové

objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

Roztok 1% kyseliny dusi né HNO₃:

12 ml 65% kyseliny dusi né HNO₃

objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

Roztok 0,1% dusi nanu st íbrného AgNO₃:

0,8 g dusi nanu st íbrného AgNO₃

objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

po pouffitím p idat 1,2 ml formaldehydu

Vývojka:

24 g uhli ítanu sodného Na₂CO₃

objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

uloflit ve 4 °C

po pouffitím p idat 1,2 ml formaldehydu a 160 l 1% roztoku thiosíranu sodného Na₂S₂O₃

Molekulární lepidlo:

1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu

3 l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Roztok 10% peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$:

1 g peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

rozpustit v 10 ml deionizované H_2O

uchovávat v temnu za teploty 4 °C

Naná-ecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

1 ml bromphenol blue ó xylene cyanole dying solution (Sigma B-3269)

9 ml formamid

4.5 Seznam poufitych p ístroj

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridiza ní pec HB-2D (Techne)
- Chladni ka kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická mícha ka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette ó 0,5 aíl 10 l (osmikanálová) a 0,3 l aíl 1 ml (ThermoLabsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 l aíl 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific Ltd.)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sekvena ní elektroforetická kom rka S2 (Whatman Biometra)
- Su-árna CAT 8050 (Contherm)
- Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)
- Termocyklér GenePro (BIOER technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- T epa ka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultra ísté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5. Výsledky

Úkolem mé diplomové práce bylo testovat mikrosatelitové lokusy, které byly polymorfní u zástupců řádu trubkonosí a zjistit, zda jsou polymorfní u nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace. Pokud byly lokusy vyhodnoceny jako polymorfní, optimalizovala jsem teplotu nasedání primerů a čas elektroforetické separace.

V první fázi experimentální části jsem testovala celkem 212 mikrosatelitových lokusů, z nichž 207 byla popsána u zástupců řádu trubkonosí (Procellariiformes), z nichž 53 pocházelo od druhů z eledí albatrosovití (Diomedidae), 100 lokusů bylo popsáno u zástupců eledí buřákovití (Procellariidae) a 54 mikrosatelitů pocházelo od jedinců z eledí buřákovití (Hydrobatidae). Testovala jsem i 4 lokusy popsané u zástupců řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), eledí kulíkovití (Charadriidae), rackovití (Laridae) a alkovití (Alcidae). Dále jsem testovala jeden lokus popsáný u zástupců řádu pěvců (Passeriiformes), eledí lesákovití (Parulidae).

Provedla jsem PCR amplifikaci pro všechny mikrosatelitové lokusy při teplotě nasedání primerů (teplota annealingu, dále jen T_a) 50 °C. Pokud při této teplotě nedošlo k amplifikaci, postupně jsem T_a snižovala až na 44 °C. Ani za teploty 44 °C nesyntetizovaly primery pro mikrosatelitové lokusy De33, Puff 4B a Patbel5 při PCR amplifikaci žádný produkt, a proto jsem je vyřadila z další analýzy. Pokud byl produkt patrně hodnotitelný, teplotu jsem zvyšovala až na 66 °C, abych s jistotou určila, zda je mikrosatelitový lokus monomorfní nebo polymorfní. Lokusy, které byly vyhodnoceny jako monomorfní, jsem vyřadila z další analýzy.

Vyhodnocením elektroforetických rozdílů produktů jsem našla celkem 46 polymorfních lokusů, z toho 45 lokusů s unikátní sekvencí. Zjistila jsem totiž, že primery pro mikrosatelitové lokusy De3 a De18 syntetizují stejný produkt. Stáhla jsem si tedy jejich sekvence z databáze GenBank, tyto sekvence jsem srovnala a zjistila jsem, že jsou totožné. Pro amplifikaci těchto sekvencí použili autoři pouze různé páry primerů. U polymorfních mikrosatelitových lokusů jsem upravovala teplotu annealingu T_a a čas elektroforetické separace, aby byly produkty co nejlépe hodnotitelné. I přesto jsem našla některé mikrosatelitové lokusy stále velký výskyt nadbytečných stutter bandů. U těchto lokusů jsem snížila koncentraci Mg^{2+} iontů na polovinu v PCR reakci

(pipetovala jsem polovi ní objem $MgCl_2$ do PCR premixu a o stejný objem jsem zvýšila množství H_2O). Když se mi podařilo dosáhnout optimálních podmínek, odečetla jsem genotypy všech 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského a určila jsem počet alel u jednotlivých lokusů. Pro jeden mikrosatelitový lokus, Pca A115, se mi nepodařilo určit genotypy všech 6 jedinců. U jedince 3 nedošlo k PCR amplifikaci. Důvodem může být výskyt nulových alel v homozygotním stavu, problém v hodnocení nebo v kvalitě použité DNA.

Charakteristiku všech mikrosatelitových lokusů v etnickém genotypu 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského jsem uvedla v tabulce 5.

Tabulka . 5: Charakteristika mikrosatelitových lokus polymorfních u nesyta indomalajského. V tabulce je uvedeno íslo lokusu z databáze GenBank, název lokusu, latinský název zdrojového druhu, sekvence primer , jednotka repetice, teplota nasedání primer (T_a), as elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu, po et alel u 6 nep íbuzných jedinc a jejich genotypizace.

íslo a název lokusu	Zdrojový druh	Sekvence primer	Jednotka repetice	T _a [°C]	as separace [min]	Po et alel	Genotypy
AF096789 De3	<i>Diomedea exulans</i>	F:CTGCCAAAAAGAATTCCTG R:CCAACAAGGACTAAGCCCAA	AC	50*	90	4	1/4 2/4 1/2 3/4 4/4 2/4
AF096799 De18		F:TCCCTGTGTGGGTTTTGAT R:CTAAGCCCAACACCAGAAGC	AC	53	90	4	1/4 2/4 1/2 3/4 4/4 2/4
AY945753 11H7		F:GCAAGCTAAGTTGGGGGTAA R:ACAGTAGGGCTGCTGCAGAT	AC	64	120	2	2/2 1/2 2/2 1/2 2/2 2/2
AY945750 10C5		F:TGGAGATGCAATTGCCTAGA R:CAGATGAGGTTTTGGCCAGT	GA/GC	65	90	2	2/2 2/2 2/2 2/2 2/2 1/2
AY945756 12H8		F:CATGCCTGAATGCACTTTGT R:CACAATGGGTATAAGATTTTGCTG	GT/AT	64	90	2	2/2 2/2 2/2 2/2 1/1 2/2
AF096805 Dc22	<i>Diomedea chrysostoma</i>	F:AGTGGGATGGGTGTATCAGG R:TGGACTAGAGGCCTTGTCTGA	CA	61	90	2	1/2 1/1 1/2 2/2 2/2 2/2
Neuvedeno BFAL4	<i>Phoebastria nigripes</i>	F:TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R:GTTTGCCATTTTAAACTGTCATTGGC	TC	63	180	2	1/2 2/2 1/2 2/2 1/2 2/2
Neuvedeno STAL18	<i>Phoebastria albatrus</i>	F:CAGTTCCAAAGAAGGAAAACC R:GTTTGGAGTGGTCTTGGGTACAGC	ATG	58	90	2	2/2 2/2 1/2 1/2 1/2 2/2
Neuvedeno STAL4		F:TCCCCAGAAAAGTGATGGAG R:GTTGGAGAACTCCCCTTCTG	TC	56	180	2	1/1 1/2 1/1 1/2 1/1 1/2

Tabulka 5.6 pokračování 1.

íslo a název lokusu	Zdrojový druh	Sekvence primer	Jednotka repetice	Ta [°C]	čas separace [min]	Počet alel	Genotypy
AY371070 Paequ3	<i>Procellaria aequinoctialis</i>	F:TGTGGGTGCAGTAGAGCA R:CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	GA	54	180	2	1/1 1/2 2/2 2/2 2/2 1/2
AY371073 Paequ7		F:TGCAGACCTGACTTTCACAGCTC R:CCTCCAAACATCCAGCCATC	GT	62	210	2	1/1 1/2 1/2 1/1 1/1 1/1
AY371074 Paequ8		F:TATTCTGAGACTTGC GTTATCC R:GTGATCCATTAGTTGATGTCTACTG	CA	54	90	4	3/4 3/3 2/4 3/3 2/2 1/3
EU029083 Cd1	<i>Calonectris diomedea</i>	F:CAAGCAGTCAGAACTCTGTG R:TGAGTTTGCCCTACATGAAC	TG/TC	66	90	4	1/4 1/4 2/3 3/4 2/4 1/4
Neuvedeno Tch6	<i>Pterodroma magentae</i>	F:GTTTCTTG GTTGGTGGCTGAAGGTGTATG R:GCCATTTGAGAATGTTTCAGC	GT	53	90	3	2/2 2/3 1/2 1/3 2/3 1/2
EU360817 Parm01	<i>Pterodroma arminjoniana</i>	F:CTGGACTCAGTGCCCTCTTC R:CAGGGCAGAAGCTCGTCTAT	CA	58	90	3	1/3 2/3 1/2 1/1 1/2 1/1
EU360818 Parm02		F:AGCAAGCTGACAGCAACAGA R:TGTTATGTCCTGCGGATGAG	CA	60	90	4	3/3 1/2 2/3 1/3 1/4 3/4
EU360821 Parm05		F:CGTATACCCTGCAGATACGC R:CTCAGTGCCAATTCGTACCC	CA	48	90	3	2/2 2/2 2/3 2/2 1/1 2/2
EU158898 Puff G2C	<i>Puffinus mauretanicus</i>	F:CTGAAATCAGACATTATTTTC R:ACAATATGCAAAC TTTTG	GT	54	90	3	2/2 2/2 1/2 1/2 2/2 2/3
EU158899 Puff G2F		F:GCTCTCCCAGTTTGCACG R:TCCCATGCTTTAACC ACTG	GT	62	90	2	2/2 1/2 2/2 1/1 2/2 2/2
HM171898 Bb22	<i>Bulweria bulwerii</i>	F:TTCACAGCAGAATCACCTCAG R:GCTCAAAGGGTGG AATTGTT	TG	50	90	2	2/2 2/2 2/2 1/2 2/2 2/2

Tabulka 5 ó pokračování 2.

íslo a název lokusu	Zdrojový druh	Sekvence primer	Jednotka repetic	Ta [°C]	as separace [min]	Po et alel	Genotypy
HQ918219 Ptero02	<i>Pterodroma sandwichensis</i>	F:AAGCGCTTCACTGGAGGA R:TGACCTGTGTGCCTTCATTC	CA	63	90	5	1/3 3/5 1/2 2/5 3/5 4/5
HQ918226 Ptero09		F:GCAAATACCAGTCTTCCAAAGG R:TTTAAGATAAAGATGTTTGAGAACCAC	AAGG	58	90	2	1/1 1/1 2/2 1/1 1/2 2/2
JX435471 Pc A105	<i>Puffinus carneipes</i>	F:ACAGGAAAGAGAAGAGGATTT R:ATGGGGAGAGCGTATGTG	CA	58	90	2	2/2 2/2 1/2 1/2 2/2 1/2
JX435473 Pc A115		F:CCCTCACCACAGGTTTATG R:CTGCCAAGTCCACCACTA	GT	55	180	2	1/1 1/2 -/- 2/2 1/2 1/1
JX435474 Pc B11		F:GTGGATCACTTGC GTTGTAC R:CGACCTCCTAACTGGATGTC	GT/ATT/ ACT	52	180	3	2/2 1/1 1/3 2/2 3/3 3/3
JX435478 Pc D3		F:CCTCTGCTCAAGTCTGTCAC R:AAACCTCCTTTGGGATGA	GATA	59	180	2	1/1 1/1 1/1 1/1 1/1 1/2
JX435479 Pc D103		F:GGAAAGATGTCATGCTGATGA R:GTGGGAGATTCATAGGCAAAG	GATA	56	90	2	1/1 1/2 1/2 1/1 1/2 1/1
JF288776 Patbel2		<i>Pachyptila belcheri</i>	F:GGTGTGTCATGCAACTGACTGAA R:CAATGGGAATGGCAGAGACT	CTAC	59	180	5
Neuvedeno Pacbel03731	F:TAGTGGACTGGTCACAGCAC R:TAGCAGCTGGAGAGCATCAG		AC	58	90	2	1/1 1/1 1/1 1/1 1/2 1/1
Neuvedeno Pacbel07265	F:CGTCACTTTAATAGCGCTGGC R:ACCCTGATTTTCCCAGTCCG		GT	56	90	2	1/2 1/1 1/1 1/2 1/2 1/1
Neuvedeno Pacbel09021	F:ATCTGCGCATGCAGTGATAG R:CACAGCTAGCAGCATTGACC		GT	62	90	2	2/2 2/2 2/2 2/2 1/2 2/2

Tabulka 5.6 pokračování 3.

Íslo a název lokusu	Zdrojový druh	Sekvence primer	Jednotka repetice	Ta [°C]	čas separace [min]	Počet alel	Genotypy
Neuvedeno Pacbel09957	<i>Pachyptila belcheri</i>	F:GCTTTATTTAAGAGCAACAAAACTTC R:ACAAAGCAAACCTAATCAT	GT	56	90	2	1/1 1/1 1/1 1/1 1/2 2/2
Neuvedeno Pacbel15327		F:TTCTTG TAGCAGTAGGAGACC R:ACCTCATGTGTAAAACCTGCC	CA	58	90	2	1/1 1/1 1/2 1/2 1/2 1/2
Neuvedeno Pacbel17529		F:TGCAAGGTCTTGTGATGAAGC R:AATGCAATTTGTCTGCGGGG	AG	60	90	2	2/2 1/2 1/1 1/2 1/2 2/2
Neuvedeno Pacbel19907		F:TTTCTCCTTAGCTCGGCAGG R:CCATACTTGGTGGCAGTGTG	AG	54	90	2	2/2 2/2 1/2 2/2 2/2 2/2
FR696385 Ole09	<i>Oceanodroma leucorhoa</i>	F:GGCCTGGATTCTGCGTGTTGGG R:CAGCTACAGGCCACGGGTGC	CA	54	90	3	2/3 1/1 2/3 3/3 1/1 2/3
FR696401 Ole25		F:CCTCCTCATCGTAGGGACTG R:TTAAAGGCAGCGATTCTGTTC	AGAT/ GAAA	61	180	3	2/2 3/3 3/3 1/3 1/2 3/3
FR696402 Ole26		F:TCAGCTTCTGGTGCAGTTATG R:TCCTGCTGATGGATAGGTTATG	TG	55	90	3	3/3 1/1 3/3 1/1 3/3 2/2
JQ303227 Omn2	<i>Oceanodroma monteiri</i>	F:GATTTCGTCTTGCTTCCAAA R:AACAAATAACCAGGATTGATAATA	AC/AT	58	90	2	1/1 1/1 1/1 1/2 1/1 1/1
JQ303232 Omn8		F:TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R:GGGGCGAGCATTACATTA	AC	58	90	4	2/3 1/3 1/1 1/1 1/3 2/4
JQ303238 Omn21		F:TTTTTAGCTCTTTTTAGCTAGCCTT R:TAACCCAGAAAAATGCAGCC	GTT	48*	90	2	1/2 1/1 1/1 1/1 1/2 2/2

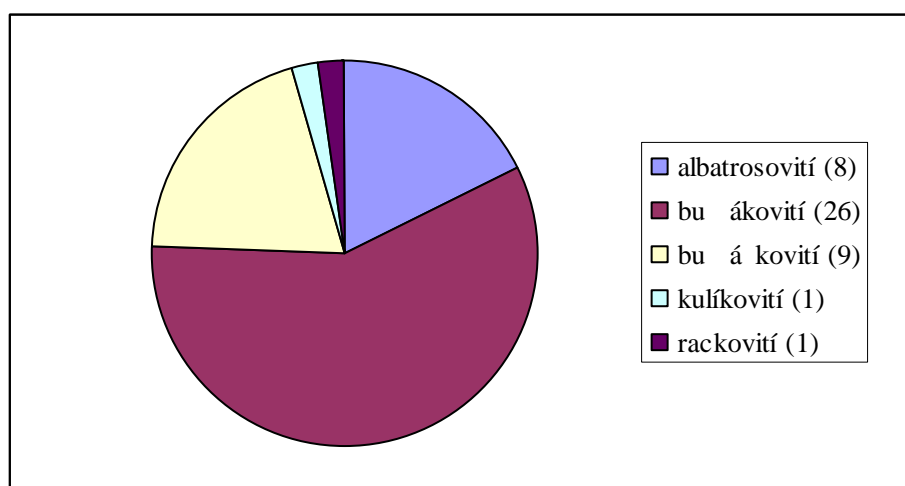
Tabulka 5 ó pokračování 4.

íslo a název lokusu	Zdrojový druh	Sekvence primer	Jednotka repetice	T _a [°C]	čas separace [min]	Počet alel	Genotypy
JQ303239 Omn22	<i>Oceanodroma monteiroi</i>	F:CAAACAAAAGAAAACCAGC R:GATCATGACAAAAGTTTCTTGC	CAA	50	180	2	2/2 1/2 2/2 1/2 1/2 1/2
JQ303240 Omn23		F:GGAAAAGGAGACTAGATCTTGTGAA R:AAAACCTTACTTTGTTATTTCCATATGTTT	TTG	56	90	2	1/1 1/2 1/1 1/1 1/1 1/2
JQ303242 Omn25		F:TCTGCTCCCCCTGATTATTG R:ACTCTGAGAGCCATCCATCA	ATGG	66	90	2	1/1 2/2 2/2 2/2 1/2 2/2
AM072445 Calex01	<i>Charadrius alexandrinus</i>	F:CTTCTCCATTGTTGTCACCTCCAGT R:GTTTCTTCTTGACTTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT/ GTGC	66	90	2	2/2 2/2 2/2 1/2 2/2 2/2
AY091853 RBG29	<i>Larus novahollandiae scopulinus</i>	F: CCTAGCTTTTTGGACTCAGT R:GTGGTGTTGCAATAGGATTC	GT	58	90	4	2/4 3/4 1/3 1/1 1/3 1/1

* Kde je ve sloupci T_a u hodnoty teploty hvězdička, znamená to, že při PCR amplifikaci byla v PCR směsi pouze poloviční koncentrace Mg²⁺, tedy jsem pipetovala poloviční objem (2 µl) roztoku MgCl₂ a o stejný objem jsem pipetovala více H₂O, aby celkový objem PCR směsi zůstal zachován.

Z 212 testovaných mikrosatelitových lokus bylo 45 vyhodnoceno jako polymorfní a unikátní, což je 21,2 % z celkového počtu. Z těchto 45 polymorfních lokus pocházelo 8 od zástupců eledí albatrosovití, což je 17,8 %. Celkem 26 lokus , vyhodnocených u nesýta indomalajského jako polymorfní, bylo popsáno u druh z eledí buřákovití, což je 57,8 %. Celkem 9 mikrosatelitových lokus pocházelo od zástupců eledí buřákovití, což je 20,0 %. Po jednom mikrosatelitové lokusu pocházelo od zástupců řádu dlouhokřídlí, eledí kulíkovití a rackovití, což pro každý lokus činí 2,2 %.

Graf . 1 Polymorfní mikrosatelitové lokusy u nesýta indomalajského rozdelené podle eledí, u jejichž zástupců byly popsány. Čísla v závorkách udávají počet mikrosatelitových lokus , popsaných u zástupců jednotlivých eledí.



Testovala jsem 53 mikrosatelitových lokus popsaných u zástupců eledí albatrosovití. Celkem 8 z nich jsem vyhodnotila jako polymorfní, což je úspěšnost 15,1 %. Nejvíce mikrosatelitových lokus , které byly polymorfní u nesýta indomalajského, bylo popsáno u zástupců eledí buřákovití. Ze 100 testovaných lokus bylo 26 polymorfních, což činí 26,0% úspěšnost. Dále jsem testovala 54 mikrosatelitových lokus od zástupců eledí buřákovití, celkem 9 z nich bylo polymorfních, což je 16,7% úspěšnost. Testovaný lokus Calex01, pocházející od zdrojového druhu kulíkovití (*Charadrius alexandrius*), byl polymorfní. Ze dvou testovaných lokus popsaných u racka novozélandského (*Larus novahollandiae scopulinus*), byl jeden, RBG29, polymorfní. Testovaný mikrosatelitový lokus Dpμ01, popsaný u lesáka

flutého (*Dendroica petechia*), byl vyhodnocen jako monomorfní a mikrosatelitový lokus Cco5-21, popsáný u zástupce rodu alkoun (*Cepphus* spp.) byl též monomorfní.

Co se tý e jednotlivých druh , nejvíce polymorfních mikrosatelitových lokus pocházejících od zástupc eledi albatrosovití pocházelo od albatrosa st hovavého (*Diomedea exulans*), a to celkem 4. Z polymorfních lokus popsáných u albatrosovitých to iní 50 % a z celkového po tu 23 testovaných lokus u tohoto druhu je to 17,4 %.

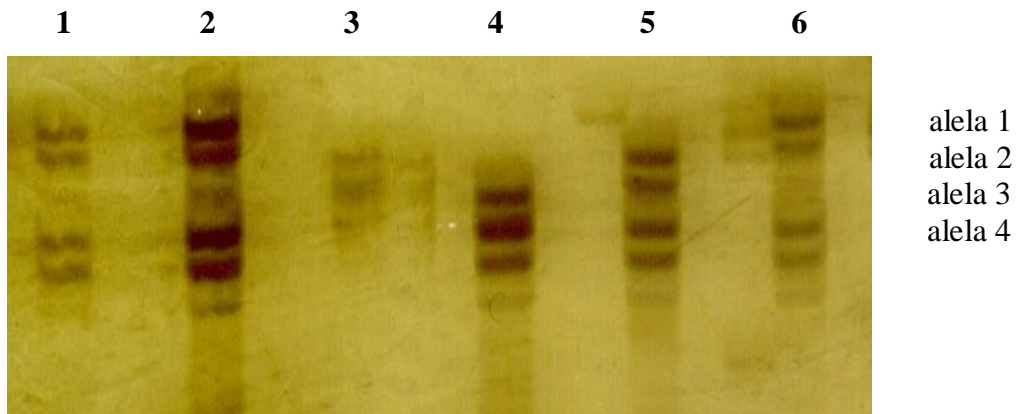
Celkem 5 mikrosatelitových lokus popsáných u bu áka sv tlenohého (*Puffinus carneipes*) z eledi bu ákovití bylo polymorfních u nesyta indomalajského, což je u eledi bu ákovití 19,2 %. Celkem jsem od bu áka sv tlenohého testovala 11 mikrosatelitových lokus , úspěšnost polymorfismu je tedy 45,5 %. Nejvíce lokus , které byly polymorfní u nesyta indomalajského, pocházelo od bu áka útlozobého (*Pachyptila belcheri*), a to celkem 8. Z po tu polymorfních lokus popsáných u zástupc eledi bu ákovití je to 30,8 %. Testovala jsem 32 mikrosatelitových lokus od tohoto druhu, úspěšnost polymorfismu je tedy relativně nízká, a to 25 %.

Z mikrosatelitových lokus popsáných u zástupc eledi bu ákovití pocházelo 6 od bu áka Monteirova (*Oceanodroma monteiroi*), což je 66,7 % z polymorfních lokus popsáných od zástupc této eledi. Od tohoto druhu jsem testovala celkem 18 lokus , úspěšnost polymorfismu je tedy 33,3 %.

Z mikrosatelitových lokus pocházejících od druh z ádu dlouhok ídlí jsem vyhodnotila jako polymorfní mikrosatelitové lokusy Calex01 a RBG29. Z celkového po tu 4 lokus iní úspěšnost polymorfismu 50 %. Tento údaj nelze brát jako sm rodatný, protože počet testovaných lokus byl malý.

Na obrázku . 1 je elektroforetogram, kde jsou vizualizované jednotlivé alely mikrosatelitového lokusu Cd1, který u 6 nep íbuzných jedinc nesyta indomalajského vykazoval 4 alely.

Obrázek . 1: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Cd1 na 6 nepříbuzných jedincích nesyta indomalajského. Jednotlivé alely jsou označeny čípkami a jedinci jsou označeni čísly.



6. Diskuze

Pro nesyta indomalajského nebyly dosud popsány žádné mikrosatelitové lokusy *de novo*, byla však na jeho DNA prováděna *cross-species* PCR amplifikace pro nalezení mikrosatelitových lokusů vhodných pro populační studie.

Konrádová (2013) prováděla ve své bakalářské práci *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů z řádu brodiví. U nesyta indomalajského našla 21 polymorfních lokusů ze 199 testovaných. Celkem 20 mikrosatelitových lokusů pocházelo od zdrojových druhů z řádu brodiví, 1 lokus byl popsán u zástupce řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes). Počet alel byl 265. (Konrádová, 2013)

Pechová (2014) ve své bakalářské práci našla u nesyta indomalajského 17 polymorfních mikrosatelitových lokusů ze 169 testovaných. Z těchto polymorfních lokusů pocházelo 9 od zástupce řádu tučáči (Sphenisciformes), dalších 3 lokusy byly popsány u druhů z řádu brodiví (Ciconiiformes), 1 pocházel od druhu z řádu potápky (Podicipediformes), 3 polymorfní lokusy byly konzervativní ptáčím mikrosatelity a 1 mikrosatelit byl EST sekvencí. Počet alel se pohyboval v rozmezí 265. (Pechová, 2014)

Ve své diplomové práci jsem hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace. Pro *cross-species* PCR amplifikaci jsem použila 212 mikrosatelitových lokusů popsáných u zástupce řádu trubkonosí, 53 lokusů bylo popsáno u druhů z čeledi albatrosovití, celkem 100 mikrosatelitů pocházelo od druhů z čeledi buřákovití a 54 mikrosatelitových lokusů bylo popsáno u druhů z čeledi buřákovití. Dále jsem použila 4 mikrosatelitové lokusy popsané u zástupce řádu dlouhokřídlí a 1 lokus pocházející od druhu z řádu pvcí. Tyto mikrosatelitové lokusy vykazovaly polymorfismus u zástupce řádu trubkonosí v dřívějších studiích.

Polymorfní mikrosatelitové lokusy popsané u zástupce čeledi albatrosovití

Z celkem 53 mikrosatelitových lokusů, které byly popsány u zástupce čeledi albatrosovití, jsem ve své práci určila 9 jako polymorfních. Celkem 5 lokusů pocházelo od albatrosa stohovavého (*Diomedea exulans*), po jednom mikrosatelitové lokusu bylo popsáno u albatrosa malého (*D. chrysostoma*) a albatrosa černonohého (*Phoebastria nigripes*). Další 2 mikrosatelitové lokusy polymorfní u nesyta indomalajského pocházely od zdrojového druhu albatros bílohřbetý (*P. albatrus*).

Burg (1999) popsala celkem 11 polymorfních mikrosatelitových lokus u albatrosa st. havavého (*D. exulans*), které jsem testovala ve své práci u nesýta indomalajského. Z těchto 11 lokus jsem 2 vyhodnotila jako polymorfní, 8 lokus bylo monomorfních a u jednoho nedošlo k amplifikaci. V experimentální části své práce jsem zjistila, že mikrosatelitové lokusy De3 a De18 syntetizují stejný produkt, a proto jsem si dohledala informace ze zdrojového odkazu. Našla jsem si sekvence z databáze GenBank a zjistila jsem, že sekvence těchto lokus je stejná, pro každý lokus však byly navrženy rozdílné páry primerů. Proto tyto mikrosatelitové lokusy mají stejný počet alel a 6 nepříbuzných jedinců má pro tento lokus stejné genotypy. Lokus De3 má u zdrojového druhu 3 alely a optimální teploty nasedání primerů (teplota annealingu, dále jen T_a) 50 °C. Já jsem detekovala 4 alely za optimální T_a 50 °C a do PCR směsi jsem přidala takový objem roztoku $MgCl_2$, aby byla koncentrace Mg^{2+} poloviční (tj. 2 μ l), a to kvůli eliminaci nadbytečných stutter bandů. Pro lokus De18 našla autorka 5 alel za optimální T_a 48 °C a já jsem detekovala, stejně jako pro lokus De3, 4 alely za T_a 53 °C. Autorka detekovala pro každý lokus rozdílný počet alel, což mohlo být způsobeno nepatřným vyhodnocením nebo přítomností nulových alel. V experimentální části mé práce nedošlo k amplifikaci lokusu De33. Burg (1999) ve své práci pro tento lokus našla 11 alel, prováděla však *cross-species* PCR amplifikaci u albatrosa malého (*D. chrysostoma*) a albatrosa černobřevého (*D. melanophris*). U těchto druhů byl lokus De33 monomorfní. Podle Bried *et al.* (2007) je tento lokus pohlavně vázaný, nachází se na Z chromozomu. Není tedy příliš vhodný pro populační studie. Ze stejného důvodu ho ze své studie populační struktury vyadili i Jouventin *et al.* (2007).

U 6 nepříbuzných jedinců nesýta indomalajského jsem testovala celkem 10 mikrosatelitových lokusů, které popsali Dubois *et al.* (2005) pro albatrosa st. havavého (*D. exulans*). Z těchto 10 lokus jsem vyhodnotila 3 jako polymorfní. Mikrosatelitový lokus 11H7 má u zdrojového druhu 10 alel a T_a 58 °C. Já jsem našla 2 alely za optimální T_a 64 °C. Pro lokus 10C5 identifikovali autoři 3 alely a T_a byla 58 °C. Já jsem našla 2 alely a optimální T_a byla 65 °C. Autoři pro lokus 12H8 našli 5 alel za optimální T_a 58 °C. Já jsem identifikovala 2 alely za optimální T_a 64 °C. Lokusy 10C5 a 12H8 byly použity při *cross-species* PCR amplifikaci u buřáka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*) z ledi buřákovití (Brown *et al.* Jordan, 2009). Pro lokus 10C5 našli autoři 2 alely, pro lokus 12H8 detekovali 4 alely a použili T_a 55 °C.

Burg (1999) také charakterizovala 15 polymorfních mikrosatelitových lokus u albatrosa malého (*D. chrysostoma*). Já jsem z těchto lokusů našla 1 jako polymorfní. Autorka detekovala pro lokus Dc22 2 alely za T_a 48 °C, já jsem ve své práci našla též 2 alely a T_a byla 61 °C.

Hernandez *et al.* (2014) popsali 5 mikrosatelitových lokusů u albatrosa černonohého (*Phoebastria nigripes*). U nesýta indomalajského byl 1 lokus polymorfní. Lokus BFAL4 má 1 u zdrojového druhu 8 alel a teplota T_a byla 60 °C. Já jsem našla u tohoto lokusu 2 alely a jako optimální T_a jsem našla 63 °C. Hernandez *et al.* (2014) dále charakterizovali 6 mikrosatelitových lokusů u albatrosa bílohlavého (*P. albatrus*), z nichž 1 mikrosatelitový lokus byl polymorfní u nesýta indomalajského. Lokus STAL18 byl u zdrojového druhu monomorfní za T_a 60 °C, auto i to zvedlo malou velikost studované populace. Auto i navíc pro tento lokus provedli *cross-species* PCR amplifikaci u albatrosa černonohého (*P. nigripes*) a albatrosa laysanského (*P. immutabilis*) a u každého z těchto druhů detekovali pro lokus STAL18 7 alel. Já jsem našla pro tento lokus 2 alely za optimální T_a 58 °C.

Polymorfní mikrosatelitové lokusy popsány u zástupců čeledi buřákovitých

Ve své práci jsem testovala 100 mikrosatelitových lokusů, které pocházely od zástupců čeledi buřákovitých. Celkem 26 z těchto lokusů jsem vyhodnotila jako polymorfní u nesýta indomalajského. Celkem 8 z těchto mikrosatelitových lokusů pocházelo od buřáka útlózobého (*Pachyptila belcheri*). Další 5 lokusů bylo popsáno u buřáka sv. tlenohého (*Puffinus carneipes*). Po 3 lokusech pocházelo od buřáka bílohlavého (*Procellaria aequinoctialis*) a buřáka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*). Po 2 lokusech bylo popsáno u zdrojových druhů buřáků baleárský (*Puffinus mauretanicus*) a buřák havajský (*Pterodroma sandwichensis*). Po 1 mikrosatelitovém lokusu pochází ze zdrojových druhů buřáků –edý (*Calonectris diomedea*), buřák taiko (*Pterodroma magentae*) a buřák Bulwerův (*Bulweria bulwerii*).

Ze 7 polymorfních mikrosatelitových lokusů, které popsali Techow *et al.* (2004) u buřáka bílohlavého (*Procellaria aequinoctialis*), jsem vyhodnotila 3 jako polymorfní. Pro lokus Paequ3 bylo u zdrojového druhu detekováno 9 alel a T_a byla 55 °C. Já jsem našla u 6 jedinců nesýta indomalajského 2 alely a našla jsem optimální T_a 56 °C. Mikrosatelitový lokus Paequ7 má 1 u zdrojového druhu 5 alel a optimální T_a 64

°C. Já jsem ve své práci detekovala 2 alely a teplota T_a byla 62 °C. Pro lokus Paequ 8 našli auto i u zdrojového druhu 3 alely za optimální T_a 58 °C a já jsem našla 4 alely a optimální T_a 54 °C. Lokus Paequ3 popsal Brown *et* Jordan (2009) při *cross-species* PCR amplifikaci u buřáka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*), kde našli 5 alel za T_a 55 °C. Dále byly lokusy Paequ3 a Paequ8 použity při zkoumání populární struktury buřáka klínocasého (*Puffinus pacificus*), kde bylo detekováno pro lokus Paequ3 u 4 různých populací 466 alel a pro lokus Paequ8 našli auto i pro 4 různé populace 366 alel. (Peck *et al.*, 2008)

Celkem 11 mikrosatelitových lokusů popsal Bried *et al.* (2008) u buřáka bělého (*Calonectris diomedea*). Z těchto lokusů byl u nesýta indomalajského 1 polymorfní. Lokus Cd1 měl u zdrojového druhu 6 alel a teplota T_a byla 58 °C. Auto i prováděly *cross-species* PCR amplifikaci u druhů albatros st. hřívavý (*D. exulans*), buřák bílobřadý (*P. aequinoctialis*) a buřák Bulwerův (*Bulweria bulwerii*). U prvního jmenovaného byl lokus Cd1 polymorfní, u druhého nedošlo k amplifikaci a u třetího byl lokus Cd1 monomorfní. Já jsem ve své práci u nesýta indomalajského našla 4 alely za optimální T_a 66 °C.

Lawrence (2008) ve své doktorské práci popsal 2 mikrosatelitové lokusy u buřáka taiko (*Pterodroma magentae*), já jsem ve své práci vyhodnotila 1 z nich, Tch6, jako polymorfní. Autorka našla pro tento lokus u zdrojového druhu 2 alely a optimální T_a byla 57 °C, já jsem ve své práci detekovala 3 alely a teplotu T_a 53 °C.

Celkem 6 nových mikrosatelitových lokusů popsal Brown *et* Jordan (2009) u buřáka trinidadského (*P. arminjoniana*). Z těchto lokusů jsem u nesýta indomalajského vyhodnotila 3 jako polymorfní. Pro lokus Parm01 našli auto i u zdrojového druhu 10 alel a optimální T_a byla 55 °C. Já jsem u nesýta indomalajského našla 3 alely za teploty T_a 58 °C. Mikrosatelitový lokus Parm02 měl u zdrojového druhu 4 alely a auto i popsal T_a 55 °C. Já jsem ve své práci též detekovala 4 alely a teplota T_a byla 60 °C. Lokus Parm05 byl v práci Brown *et* Jordan (2009) u zdrojového druhu monomorfní, vykazoval však polymorfismus u dalších druhů z rodu *Pterodroma*. U buřáka proměnlivého (*P. neglecta*) byly nalezeny 2 alely, dále u buřáka madeirského (*P. madeira*) našli auto i 3 alely a u buřáka kapverdiského (*P. feae*) našli auto i 2 alely. Optimální T_a byla 55 °C. V mé práci měl lokus Parm05 u nesýta indomalajského 3 alely a optimální teplota T_a byla 48 °C.

U buřáka baleárského (*Puffinus mauretanicus*) popsal Gonzalez *et al.* (2009) celkem 10 mikrosatelitových lokusů. Z těchto lokusů byly 2 u nesýta indomalajského

polymorfní, 7 jsem určila jako monomorfní a u lokusu Puff 4B nedošlo k amplifikaci. Mikrosatelitový lokus Puff G2C vykazoval u zdrojového druhu 7 alel za optimální T_a 50 °C. Při *cross-species* PCR amplifikaci, kterou auto i prováděli u buřáka stedomského (*P. yelkouan*), našli u tohoto druhu 6 alel. Já jsem našla u nesýta indomalajského 3 alely a optimální T_a byla 54 °C. Pro lokus Puff G2F detekovali auto i 2 alely za T_a 60 °C a u buřáka stedomského byl tento lokus monomorfní. Já jsem ve své práci našla 2 alely a optimální T_a 62 °C.

Andris *et al.* (2010) popsali 11 mikrosatelitových lokusů u buřáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), u nesýta indomalajského byl 1 z nich polymorfní. Pro lokus Bb22 detekovali auto i 2 alely za T_a 58 °C. Dále prováděli *cross-species* PCR amplifikaci u buřáka bobradého (*P. aequinoctialis*) a buřáka modravého (*Halobaeba caerulea*) z eledí buřákovití a u buřáka Monteirova (*Oceanodroma monteiroi*) z eledí buřákovití. U všech těchto druhů byl lokus Bb22 polymorfní, auto i však neuvedli počet alel. Já jsem ve své práci našla 2 alely a optimální T_a byla 50 °C.

U buřáka havajského (*Pterodroma sandwichensis*) popsali Welch *et* Fleischer (2011) celkem 10 mikrosatelitových lokusů. U nesýta indomalajského byly 2 lokusy polymorfní. Pro lokus Ptero02 detekovali auto i u zdrojového druhu 5 alel za optimální T_a 53 °C. U nesýta indomalajského měl tento lokus celkem 5 alel. Optimální T_a byla 63 °C. Lokus Ptero09 měl u zdrojového druhu 7 alel a T_a 53 °C. Já jsem ve své práci našla 2 alely za optimální T_a 58 °C.

Hardesty *et al.* (2012) popsali 11 mikrosatelitových lokusů u buřáka sv tlenohého (*Puffinus carneipes*). U nesýta indomalajského bylo 5 lokusů polymorfních. Pro lokus Pc A105 našli auto i u zdrojového druhu 8 alel a teplota T_a byla 55 °C. Já jsem u nesýta indomalajského detekovala 2 alely a optimální T_a byla 58 °C. U zdrojového druhu měl lokus Pc A115 10 alel a T_a byla 55 °C. Já jsem ve své práci pro tento lokus našla 2 alely za optimální T_a 55 °C. Mikrosatelitový lokus Pc B11 vykazoval u zdrojového druhu 5 alel za T_a 55 °C a já jsem detekovala u nesýta indomalajského 3 alely a optimální T_a 52 °C. Auto i našli pro lokus Pc D3 6 alel a T_a byla 55 °C. V mé práci tento lokus vykazoval 2 alely za optimální T_a 59 °C. Pro mikrosatelitový lokus Pc D103 detekovali auto i u zdrojového druhu 6 alel za T_a 55 °C a v mé práci jsem u nesýta indomalajského našla 2 alely a optimální T_a 56 °C.

Quillfeldt *et al.* (2011) charakterizovali 7 mikrosatelitových lokusů u buřáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*). V mé práci u nesýta indomalajského byl 1 lokus polymorfní, 5 lokusů bylo monomorfních a u 1 lokusu nedošlo k amplifikaci. Pro lokus

Patbel2 identifikovali auto i 16 alel, které se v-ak p íli- neli-ily svou délkou, a tak byl tento lokus vyhodnocen jako nevhodný pro analýzu paternity. Optimální teplotu T_a auto i neuvád jí. Já jsem pro tento lokus našla u nesyta indomalajského 5 alel a optimální T_a byla 59 °C. Jednotlivé alely se též p íli- neli-í svou délkou. V mé práci nedo- lo k amplifikaci mikrosatelitového lokusu Patbel5. Quillfeldt *et al.* (2011) tento lokus ur íli jako nevhodný pro analýzu paternity, protože je s nejv t-í pravd podobností lokalizován na Z chromozomu.

Dal-ích 25 mikrosatelitových lokus u bu áka útlozobého (*P. belcheri*) popsali Moodley *et al.* (2015). Z t chto lokus jsem u nesyta indomalajského charakterizovala 7 jako polymorfní. Pro lokus Pacbel03731 detekovali auto i 48 alel, T_a byla u v-ech mikrosatelitových lokus stejná, a to 56 °C. Já jsem pouffila u nesyta indomalajského optimální T_a 58 °C. Mikrosatelitový lokus Pacbel07265 m l u zdrojového druhu 15 alel, v mojí práci byla optimální T_a 56 °C. Pro lokus Pacbel09021 našli auto i 17 alel, v mé práci jsem p í PCR reakci pouffila T_a 62 °C. Lokus Pacbel09957 vykazoval u zdrojového druhu 10 alel, optimální T_a v mojí práci pro tento lokus byla 56 °C. Pro lokus Pacbel15327 detekovali auto i 8 alel, v mé práci byla optimální T_a 58 °C. Lokus Pacbel17529 m l u zdrojového druhu 12 alel, já jsem pouffila optimální T_a 60 °C. Pro lokus Pacbel19907 našli auto i 8 alel, v mé práci byla optimální T_a 54 °C. V-echno tyto mikrosatelitové lokusy m ly v mojí práci u nesyta indomalajského 2 alely.

Polymorfní mikrosatelitové lokusy popsané u zástupc eledí bu á kovití

Ve své práci jsem testovala 54 mikrosatelitových lokus popsaných u zástupc eledí bu á kovití. Celkem 9 lokus bylo polymorfních u nesyta indomalajského. Z toho 6 lokus pochází od bu áka Monteirova (*Oceanodroma monteiroi*) a dal-í 3 lokusy byly popsány u bu á ka dlouhok ídlého (*O. leucorhoa*).

Bicknell *et al.* (2011) charakterizovali 27 mikrosatelitových lokus u bu á ka dlouhok ídlého (*O. leucorhoa*), u nesyta indomalajského byly 3 z t chto lokus polymorfní. Pro lokus Ole09 detekovali auto i 2 alely za optimální T_a 60 °C. Já jsem stanovila optimální T_a jako 54 °C. Lokus Ole25 m l u zdrojového druhu 7 alel a T_a byla 60 °C, v mé práci byla optimální T_a 61 °C. Pro lokus Ole26 našli Bicknell *et al.* (2011) 2 alely za T_a 60 °C a já jsem u nesyta indomalajského pouffila optimální T_a 55 °C. Každý z t chto mikrosatelitových lokus m l u nesyta indomalajského 3 alely.

Bried *et al.* (2012) popsali 18 mikrosatelitových lokus u bu á ka Monteirova (*Oceanodroma monteiroi*). V mé práci bylo u nesyta indomalajského 6 lokus polymorfních. Pro lokus Omn2 auto i detekovali 7 alel, pro všechny lokusy poufili p i PCR amplifikaci stejnou T_a , a to 58 °C. Já jsem pro lokus Omn2 našla 2 alely za optimální T_a 58 °C. Mikrosatelitový lokus Omn8 m l u zdrojového druhu 10 alel, já jsem detekovala 4 alely a teplota T_a byla 58 °C. Pro lokus Omn21 našli auto i 6 alel, v mé práci m l lokus u nesyta indomalajského 2 alely a optimální T_a 48 °C. Do PCR premixu jsem přidala polovinu objemu $MgCl_2$, abych dosáhla polovinu koncentrace Mg^{2+} iontů v PCR reakci. Pro každý alel u zdrojového druhu pro lokus Omn22 byl 9, já jsem našla celkem 2 alely a T_a byla 50 °C. Auto i ve své práci zjistili, že mikrosatelitový lokus Omn23 je pohlavně vázaný a nachází se na Z chromozomu. Auto i pro něj detekovali 4 alely a u nesyta indomalajského m l tento lokus 2 alely a teplotu T_a 56 °C. Lokus Omn25 m l u zdrojového druhu 5 alel, já jsem detekovala 2 alely za optimální T_a 66 °C. Bried *et al.* (2012) provedli *cross-species* PCR amplifikaci, u bu á ka madeirského (*O. castro*) byly všechny lokusy kromě Omn23 polymorfní.

Polymorfní mikrosatelitové lokusy popsáné u zástupců ostatních řádů

Testovala jsem 5 mikrosatelitových lokus popsáných u zástupců jiných řádů, které vykazovaly polymorfismus u zástupců řádu trubkonosí. Z těchto lokus jsem 2 vyhodnotila jako polymorfní, a to Calex01 a RBG29.

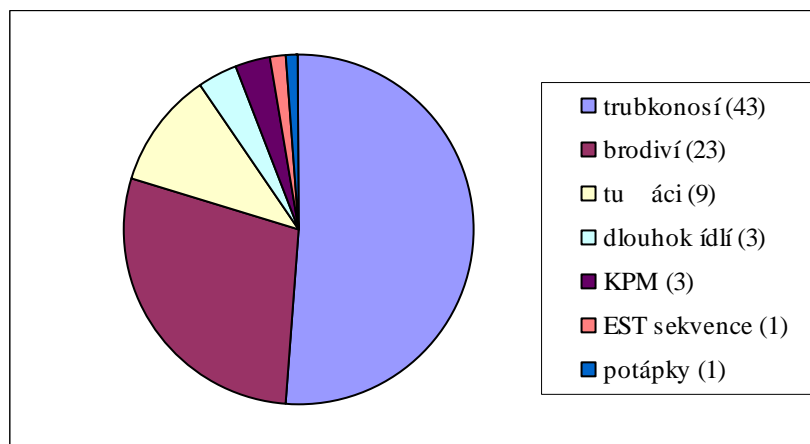
Küpper *et al.* (2007) popsali 36 polymorfních mikrosatelitových lokus u kulíka mo ského (*Charadrius alexandrinus*), jeden z nich jsem testovala ve své práci u nesyta indomalajského a vyhodnotila jsem ho jako polymorfní. Lokus Calex01 m l u zdrojového druhu 10 alel a optimální T_a 62 °C. Tento lokus poufili Brown *et* Jordan (2009) p i *cross-species* PCR amplifikaci u bu á ka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*), kde m l lokus Calex01 4 alely a T_a 55 °C. Já jsem ve své práci našla pro Calex01 2 alely a optimální T_a byla 66 °C.

Celkem 7 mikrosatelitových lokus popsali Given *et al.* (2002) u racka novozélandského (*Larus novahollandiae scopulinus*), 2 lokusy jsem testovala ve své práci u nesyta indomalajského a jeden z nich byl polymorfní. Lokus RBG29 m l u zdrojového druhu 5 alel a teplota T_a byla 50 °C. Welch *et* Fleischer (2011) poufili tento lokus p i *cross-species* PCR amplifikaci u bu á ka havajského (*Pterodroma sandwichensis*) a našli 14 alel za optimální T_a 53 °C.

Mikrosatelitový lokus Dpμ01 m l u zdrojového druhu, les á ka flutého (*Dendroica petechia*) 22 alel (Dawson *et al.*, 1997). Friesen *et al.* (2006) pouffili lokus Dpμ01 p i zkoumání vztah mezi 5 populacemi bu áka tmavoh betého (*Pterodroma phaeopygia*) a detekovali 2611 alel pro 5 r zných populací. U nesyta indomalajského byl tento lokus monomorfní. Lokus Cco5-21 byl pouffit ve stejné práci a auto i našli 2611 alel u 5 r zných populací (Friesen *et al.*, 2006). Já jsem ve své práci tento lokus u nesyta indomalajského téfl vyhodnotila jako monomorfní.

Je známo celkem 83 mikrosatelitových lokus , které jsou polymorfní u nesyta indomalajského. Jejich rozd lení podle ád , u kterých byly popsány, jsem uvedla v grafu . 2.

Graf . 2 ó V-echny mikrosatelitové lokusy, které byly polymorfní u nesyta indomalajského, rozd lené podle ád , u kterých byly popsány.



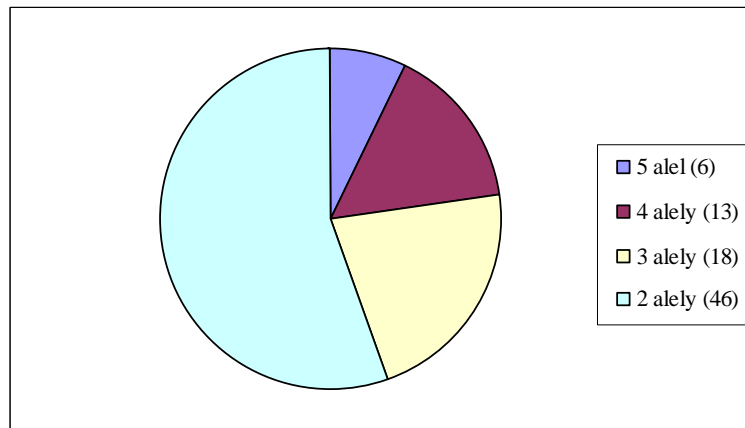
KPM = Konzervativní pta í mikrosatelity

Celkem 43 mikrosatelitových lokus , které byly polymorfní u nesyta indomalajského, pochází od zdrojových druh z ádu trubkonosí. Úsp –nost polymorfismu u t chto mikrosatelit íní 20,8 %. Podle bakalá ských prací Konrádové (2013) a Pechové (2014) byla úsp –nost polymorfismu u mikrosatelit popsáných u druh z ádu brodiví 12,0 %. Jelikofl je nesyt indomalajský zástupcem ádu brodiví, byla o ekávaná vy—í úsp –nost polymorfismu u mikrosatelit popsáných u druh z tohoto ádu. Pechová (2014) ve své bakalá ské práci m la úsp –nost polymorfismu u mikrosatelit pocházejících od zástupe ádu tu áci 11,7 %. ády trubkonosí a tu áci jsou blízce p íbuzné (Hackett *et al.*, 2008) a je zajímavé, fle u tu ák byla zji–ta

podobná úspěšnost polymorfismu jako u brodivých, zatímco tubkonosí vykazovali skoro dvakrát vyšší úspěšnost polymorfismu než brodiví i tučáci.

Vzhledem k tomu, že u mikrosatelit je důležitý polymorfismus, v grafu 3 uvádím rozdělení všech 83 polymorfních mikrosatelitových lokusů na základě počtu alel u 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského. Vycházím z informací od vedoucího mé diplomové práce, který potvrdil, že Konrádová (2013) a Pechová (2014) testovali polymorfismus na stejných 6 jedincích, které jsem analyzovala ve své práci. (Nádvorník, osobní sdělení)

Graf 3 Rozdělení polymorfních mikrosatelitových lokusů u nesyta indomalajského podle počtu alel. Čísla v závorkách udávají počet lokusů.



Jelikož nesyta indomalajský patří mezi velmi vzácné a ohrožené druhy, bylo by vhodné hledat další polymorfní mikrosatelitové lokusy a otestovat také mikrosatelity známé u šedých veslonožů a plameňáků. Tyto mikrosatelity jsou již v laboratorní populaci genetiky testovány (Nádvorník, osobní sdělení). Pokud by bylo třeba dalších polymorfních mikrosatelitů u nesyta indomalajského, navrhovala bych testování mikrosatelitů popsáných od druhů z čeledi dlouhokřídlí, a to z toho důvodu, že jsem ve své práci označila 2 ze 4 testovaných jako polymorfní a 1 ze 2 testovaných mikrosatelitů pocházejících od druhů z čeledi dlouhokřídlí vykazoval polymorfismus v práci Konrádové (2013).

7. Závěr

Ve své diplomové práci jsem pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy u nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Testovala jsem všechny mikrosatelitové lokusy, které byly popsány u zástupců řádu trubkonosí (Procellariiformes), křídla albatrosovití (Diomedae), buňákovití (Procellariidae) a buňákovití (Hydrobatidae). Dále jsem testovala několik mikrosatelit popsaných u zástupců řádů dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pivoňci (Passeriiformes), které byly polymorfní u zástupců řádu trubkonosí.

Z celkového počtu 212 testovaných mikrosatelitových lokusů jsem našla 46 polymorfních, respektive 45 originálních, protože 2 zjištěné polymorfní mikrosatelity byly ve skutečnosti 1 lokus amplifikovaný 2 různými páry primerů. U polymorfních lokusů jsem určila optimální teplotu nasedání primerů (T_a) při PCR reakci a optimální dobu elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu. Dále jsem určila genotypy 6 nepříbuzných jedinců nesýta indomalajského (*M. leucocephala*) pro jednotlivé polymorfní lokusy. Nejvíce polymorfních lokusů, polymorfních u nesýta indomalajského, poskytl druh buňák útlózobý (*Pachyptila belcheri*). Z 32 testovaných mikrosatelitů bylo 8 polymorfních, což činí 25 %. Nejvíce úspěšnost polymorfismu však byla u mikrosatelitů pocházejících od buňáka sv. tlenohého (*Puffinus carneipes*), kde bylo polymorfních 5 lokusů z 11. Úspěšnost tedy byla 45,5 %. Nejvíce polymorfismus byl zjištěn u mikrosatelitových lokusů Ptero02, který byl popsán u buňáka havajského (*Pterodroma sandwichensis*) a Patbel2, který pocházel od buňáka útlózobého (*P. belcheri*). U každého z těchto lokusů bylo detekováno 5 alel.

Polymorfní mikrosatelitové lokusy, které jsem našla u nesýta indomalajského, a které pocházejí od zdrojových druhů z řádů trubkonosí a dlouhokřídlí, by mohly být použity v populačních studiích a analýzách paternity nesýta indomalajského.

8. Seznam zkratk

DNA ó deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleotic acid)

PCR ó polymerázová et zová reakce (polymerase chain reaction)

SNPs ó jednoduché nukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms)

SSRs ó jednoduché tandemové repetice (single sequence repeats)

ssDNA ó jedno et zcová DNA (single strand DNA)

STRs ó krátké tandemové repetice (short tandem repeats)

T_a ó teplota nasedání primer (annealing temperature)

9. Literárny zdroj

Andris, M., Dubios, M., 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* 10: 1106-1108.

Anmarkrud, J.A., Kleven, O., Bachmann, L., Lifjeld, J.T. (2008): Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evolutionary Biology* 8: 138.

Anonymus (2012): BirdLife International: *Mycteria leucocephala*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. www.iucnredlist.org. Downloaded on 06 April 2015.

Anonymus (2013A): BirdLife International: *Mycteria cinerea*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. www.iucnredlist.org. Downloaded on 06 April 2015.

Anonymous (2013B): BirdLife International: *Mycteria ibis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. www.iucnredlist.org. Downloaded on 06 April 2015.

Barbarà, 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.

Brant, H.A., Jago, C.H., Snodgrass, J.W., Lawrence, B.A., Gariboldi, J.C. (2002): Potential risk to wood stork (*Mycteria americana*) from mercury in Carolina Bay fish. *Environmental Pollution* 120: 405-413.

Bried, J., Nicolaus, M., Jarne, P., Dubios, M., Jouventin, P. (2007): Population biology of the wandering albatross (*Diomedea exulans*) in the Crozet and Kerguelen archipelagos, southern Indian ocean approached through genetic and demographic methods. *Journal of Zoology* 272: 206-219.

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

Bried, J., Andris, M., Dubios, M., 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* 12: 779-781.

Brooke, M. de L. (2004): Albatrosses and petrels across the world. Oxford University Press, Oxford, New York.

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 characterisation of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology* 8: 335-346.

Burg, T.M., Croxall, J.P. (2001): Global relationships amongst black-browed and grey-headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. *Molecular Ecology* 10: 2647-2660.

- Burg, T.M., Croxall, J.P. (2004): Global population structure and taxonomy of the wandering albatross species complex. *Molecular Ecology* 13: 2345-2355.
- Dawson, R.J.G., Gibbs, H.L., Hobson, K.A., Yererinac, S.M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (The yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity* 79: 506-514.
- Dubios, M.P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes* 5: 905-907.
- Elliott, A. (1992): Family Ciconiidae (Storks). Pp. 436-465. In Del Hoyo, J., Elliott, A., & Sargatal, J. (Eds.): *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 1. Lynx Edicions, Barcelona.
- Ericson, P.G.P., Anderson, C.L., Britton, T., Elzanowski, A., Johansson, U.S., Källersjö, M., Ohlson, J.I., Parsons, T.J., Zuccon, D., Mayr, G. (2006): Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters* 2: 543-547.
- Friesen, V.L., González, J.A., Cruz-Delgado, F. (2006): Population genetic structure and conservation of the Galápagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Conservation Genetics* 7: 105-115.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): *Zoologie obratlovců*. Academia - nakladatelství Akademie v České republice, Praha.
- Galbusera, P., van Dongen, S., Matthysen, E. (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1: 163-168.
- Gibb, C.G., Kennedy, M., Penny, D. (2013): Beyond phylogeny: peleciform and ciconiiform birds and long-term niche stability. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68: 229-238.

Gill, F., Donker, D. (2015): IOC World Bird List [online]. www.worldbirdnames.org, Rushland, PA, USA. Version 5.1. Downloaded on 06 April 2015.

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: 4166418.

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: 104461046.

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Leger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, P., Revardel, E., Salin, F., Petit, R.J. (2011): Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 5916611.

Hackett, S. J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowle, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Andrew Cox, W., Han Kin-Lan, 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: 176061768.

Hancock, J.A., Kushlan, J.A., Kahl, M.P. (1992): *Storks, ibises and spoonbills of the world*. Academic Press, London.

Hardesty, B.D., Metcalfe, S.S., Wilcox C. (2012): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources* 5: 27629.

Hernandez, L.D., Lounsberry, 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: 4916493.

Jouventin, P., Charmantier, A., Dubios, M., Jarne, P., Bried, J. (2007): Extra-pair paternity in the strongly monogamous Wandering Albatross *Diomedea exulans* has no apparent benefits for females. *Ibis* 149: 67678.

Kalam, A., Urfi, A.J. (2008): Foraging behaviour and prey size of the painted stork. *Journal of Zoology* 274: 1986204.

Konrádová, D. (2013): Cross-species amplifikace mikrosatelit z řádu brodiví u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických Obor P F UP v Olomouci).

Küpper, C., Horsburgh, C.J., Dawson, D.A., French-Constant, R., Székely, T., Burke, T. (2007): Characterization of 36 polymorphic microsatellite loci in the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) including two sex-linked loci and their amplification in four other *Charadrius* species. *Molecular Ecology Notes* 7: 35639.

Lawrence, H. A. (2008): Conservation genetics of the world's most endangered seabird, the Chatham island taiko (*Pterodroma magentae*). A thesis presented in fulfillment of the requirements for the degree of Doktor of Philosophy in Molecular BioSciences at Masary University, Auckland, New Zealand.

Mayr, G. (2003): The phylogenetic affinities of the Shoebill (*Balaeniceps rex*). *Journal of Ornithology* 144: 1576175.

Mayr, G. (2008): Avian higher-level phylogeny: well-supported clades and what we can learn from a phylogenetic analysis of 2954 morphological characters. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46: 63672.

Meganathan, T., Urfi, A.J. (2009): Inter-Colony Variations in Nesting Ecology of Painted Stork (*Mycteria leucocephala*) in the Delhi Zoo (North India). *Waterbirds* 32: 3526356.

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., Philips, 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*. Early online..

Oliveira, E.J., Gomes Pádua, J., Imaculada Zucchi, M., Vencovsky, R., Carneiro Vieira, M.L. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 2946307.

Onley, D., Scofield, P. (2007): Field guide to the albatrosses, petrels and shearwaters of the world. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Pechová, A. (2014): Cross-species amplifikace mikrosatelit z řádu tuáci a konzervovaných ptáčích mikrosatelit u nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických Obor P F UP v Olomouci).

Peck, P.R., Bancroft, W.J., Congdon, B.C. (2008): Morphological and molecular variation within an ocean basin in wedge-tailed shearwaters (*Puffinus pacificus*). *Marine Biology* 153: 111361125.

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: 3486360.

Quillfeldt, P., Masello, J.F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Oriole *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology* 153: 3676373.

Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. *Permanent Genetic Resources* 9: 9136915.

†Mastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros, Praha.

Techow, N.M.S.M., O’Ryan, C. (2004): Characterization of microsatellite in White-chinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes* 4: 33635.

Van Treuren, R. (1998): Estimating null allele frequencies at a microsatellite locus in the oystercatcher (*Haematopus ostralegus*). *Molecular Ecology* 7: 141361417.

Warham, J. (1996): *The Behaviour, Population, Biology and Physiology of the Petrels*. Academic Press, London.

Welch, A.J., Fleischer, R.C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetic Resources* 3: 5816584.

Whistler, H. (1940): *Popular handbook of Indian Birds*. Fourth edition. Gurney and Jackson, London.

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, C. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1616.