

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2019**

**Aneta Hudzieczková**

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



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů  
z řádu trubkonosí u pelikána bílého  
(*Pelecanus onocrotalus*)**

**Bakalářská práce**

**Aneta Hudzieczková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2019**

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

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

V Olomouci dne 10. 5. 2019

Mé poděkování patří vedoucímu práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za poskytnuté materiály, odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při zpracování teoretické a experimentální části této práce.

## Souhrn

V této bakalářské práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace.

V teoretické části jsem popsala řád pelikáni, čeleď pelikánovití a pelikána bílého jako testovaný druh, včetně jeho obtížného zařazení do systému, který je stále předmětem studií. Dále je zde uvedena charakteristika mikrosatelitů, jejich dělení, mutace a význam. Na konci jsou popsány *de novo* a *cross-species* mikrosatelity určené pro testování na pelikánu bílém.

V praktické části jsem testovala polymorfismus mikrosatelitních lokusů na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého užitím 213 párů primerů, z nichž 207 bylo izolováno z řádu trubkonosí, 5 z řádu dlouhokřídlí a 1 pocházel od zástupce z řádu pěvci. Tyto páry primerů poskytly u zástupců z řádu trubkonosí polymorfní produkt, proto byly do testování zahrnuty. *Cross-species* PCR amplifikací jsem detekovala 46 párů primerů poskytujících 47 polymorfních produktů, protože pár primerů Dc5 poskytuje produkty dva. Ze zbytku bylo 163 monomorfních a čtyři ani při teplotě *annealingu* 44 °C neposkytly žádný produkt.

## Summary

In this bachelor thesis, I focused on finding polymorphic microsatellite loci of the Great White Pelican using cross-species PCR amplification.

In the theoretical part, I described the order Pelecaniformes, family Pelecanidae and the Great White Pelican as a tested species. I also mentioned the problems with its classification which still makes this species a study object. Furthermore, there is a characteristic of microsatellites, their classification, mutation and utilization. At the end of this part, I described de novo and cross-species pairs of primers that were derived from the original species and used for testing.

In the practical part, I tested 213 microsatellite loci using appropriate pairs of primers. Two hundred and seven pairs of primers were designed for the Procellariiformes species, another six pairs of primers were originally designed for the Charadriiformes and Passeriformes. *Cross-species* PCR amplification along with these pairs of primers provided a polymorphic product to the representatives of Procellariiformes and because of that were included into the experiment. Using *cross-species* PCR amplification, I detected 46 polymorphic loci with 47 polymorphic PCR products. The reason is that one pair of primers amplified two regions of polymorphism. 163 microsatellite loci were monomorphic and 4 microsatellite loci did not provide any product.

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární přehled.....</b>	<b>3</b>
3.1 Zařazení pelikánů do systému.....	3
3.2 Řád pelikáni .....	4
3.2.1 Čeleď pelikánovití .....	5
3.2.2 Pelikán bílý .....	6
3.3 Mikrosatelity .....	7
3.3.1 Mikrosatelity od druhů z řádu trubkonosí.....	8
<b>4 Materiál a metody .....</b>	<b>18</b>
4.1 Biologický materiál.....	18
4.2 PCR amplifikace DNA pelikána bílého.....	18
4.3 Zpracování PCR produktů elektroforetickou separací.....	22
4.4 Použité chemikálie .....	24
4.5 Použité roztoky .....	24
4.6 Laboratorní přístroje .....	26
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>28</b>
<b>6 Diskuze.....</b>	<b>37</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>46</b>
<b>8 Použitá literatura .....</b>	<b>47</b>

## Seznam zkratek

A	adenin
bp	pár bází ( <i>base pair</i> )
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOP-PCR	PCR amplifikace s degenerovanými oligonukleotidovými primery ( <i>Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR</i> )
G	guanin
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
SSRs	jednoduché opakující se sekvence ( <i>Simple Sequence Repeats</i> )
T	thymin
T <sub>A</sub>	teplota <i>annealingu</i>



## Seznam obrázků

<b>Obrázek č. 1:</b> Schéma klasifikace kladu Aequorlitorornithes (Prum <i>et al.</i> , 2015).....	4
<b>Obrázek č. 2:</b> Graf rozdělení 46 polymorfních mikrosatelitních lokusů podle čeledí a druhů, ze kterých byly původně izolovány. ....	33
<b>Obrázek č. 3:</b> Graf rozdělení 47 mikrosatelitů podle počtu alel amplifikovaných 46 páry primerů, odvozených od zástupců z řádu trubkonosí a dlouhokřídli, které poskytly <i>cross-species</i> PCR amplifikací polymorfní produkt.....	34
<b>Obrázek č. 4:</b> Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Cd1 testovaného na šesti nepříbuzných jedincích pelikána bílého. ....	36
<b>Obrázek č. 5:</b> Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Cd3 testovaného na šesti nepříbuzných jedincích pelikána bílého. ....	36

## Seznam tabulek

<b>Tabulka č. 1:</b> Složení PCR mixu pro 6 vzorků.....	18
<b>Tabulka č. 2:</b> Seznam mikrosatelitů izolovaných od zástupců druhů z řádu trubkonosí, které byly testovány na polymorfismus u jedinců pelikána bílého.....	19
<b>Tabulka č. 3:</b> Seznam mikrosatelitů izolovaných od zástupců druhů z řádu dlouhokřídli a pěvci, které byly testovány na polymorfismus u jedinců pelikána bílého. ....	21
<b>Tabulka č. 4:</b> Charakteristika 46 polymorfních mikrosatelitů, které byly testovány na 6 nepříbuzných jedincích pelikána bílého.. ....	29
<b>Tabulka č. 5:</b> Genotypy 47 polymorfních mikrosatelitních lokusů získaných <i>cross-species</i> PCR amplifikací s 46 páry primerů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. ....	34
<b>Tabulka č. 6:</b> Přehled polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí, které byly pomocí <i>cross-species</i> PCR amplifikovány u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (tato práce) a současně byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (Kopečná, 2018), pelikána kadeřavého (Verešová, 2018), plameňáka karibského (Strejčková, 2016), plameňáka růžového (Kůrová, 2017), potápky roháče (Janušová, 2015) a nesyta indomalajského (Nedvědová, 2015). ....	43

# 1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké repetitivní sekvence s délkou jednotky repeticce 1–6 bp, vyskytující se v genomech prokaryotních a v kódujících i nekódujících oblastech genomu eukaryotních organismů. Mikrosatelity mají vysokou informativní hodnotu, jsou to kodominantní, multialelické genetické markery. Umožňují genetické mapování mnoha organismů, své uplatnění mají i ve forenzní analýze nebo při studiu struktury populace. Z důvodu vysokých nároků na izolaci mikrosatelitů *de novo* se u příbuzných druhů využívá metoda *cross-species* PCR amplifikace.

V této bakalářské práci budu metodou *cross-species* PCR amplifikace testovat mikrosatelitní lokusy u šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Páry primerů, které budu používat, amplifikují polymorfní mikrosatelitní lokusy u zástupců řádu trubkonosí, dlouhokřídlí a pěvci. Páry primerů navržené pro zástupce řádu dlouhokřídlí a pěvci poskytly polymorfní produkty u některého zástupce z řádu trubkonosí, a proto budou do testování zařazeny.

## 2 Cíle práce

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

## 3 Literární přehled

### 3.1 Zařazení pelikánů do systému

Donedávna byli pelikáni klasifikováni do řádu veslonozí, do kterého byli na základě společných morfologických znaků řazeni ptáci šesti čeledí – anhingovití (Anhingidae) kormoránovití (Phalacrocoracidae), faetonovití (Phaethontidae), fregatkovití (Fregatidae), terejovití (Sulidae) a pelikánovití (Pelecanidae). Mezi znaky spojující všechny zástupce patří plovací blána mezi prsty, roztažitelný krční vak a péče obou rodičů o mláďata (Gosler, 1994).

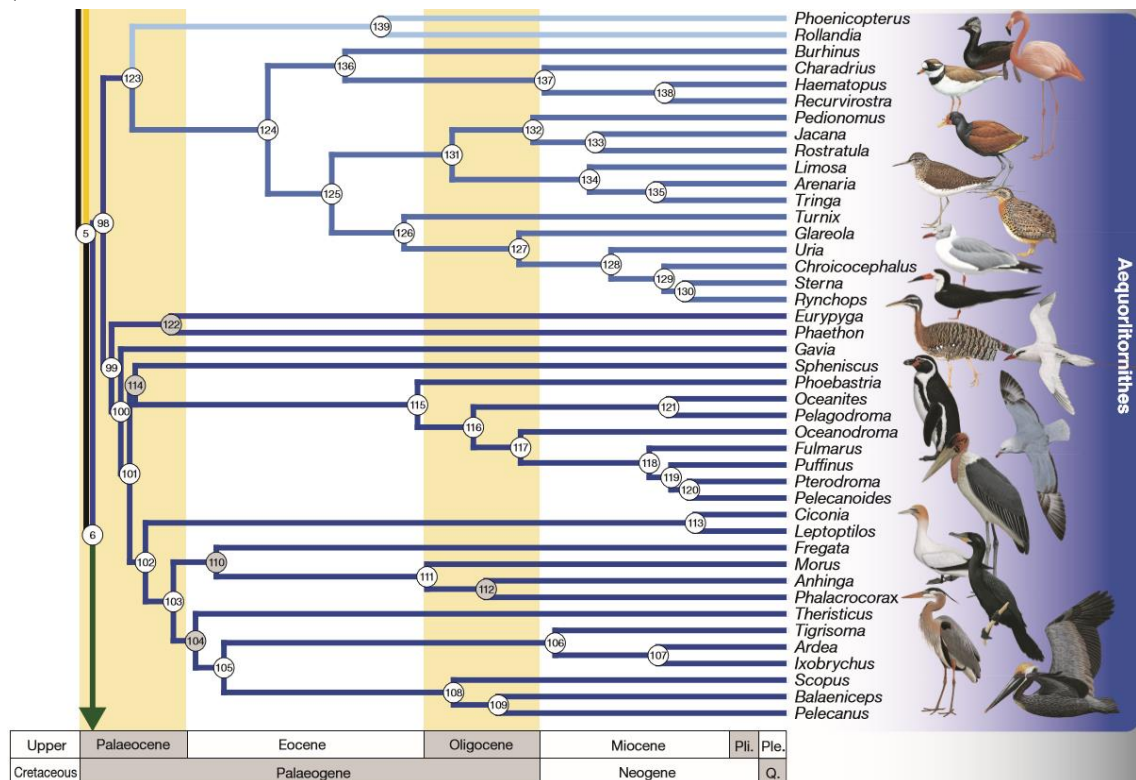
Hedges *et Sibley* (1994) popřeli monofyletický původ řádu veslonozí testováním 16 druhů ptáků z tohoto řádu a jejich příbuzných. Pelikáni byli označeni jako nejpříbuznější k člunozobci africkému (*Balaeniceps rex*). Autoři tak vyvrátili největší příbuznost pelikánů s tereji a kormorány, která byla dříve vytvořena pouze na základě morfologické podobnosti. DNA-DNA hybridizace zjistila mezi sebou největší příbuznost terejovitých, anhingovitých a kormoránovitých. Skupina fregatkovití byla z této skupiny vyloučena a označena jako sesterská větev tučňáků. Menší příbuznost terejovitých, anhingovitých a kormoránovitých s fregatkovitými potvrdila i analýza mitochondriální DNA, při které byla nalezena největší shoda fregatkovitých s kondory.

Mayr (2003) označil řády veslonozí a brodiví jako polyfyletické a čeled' faetonovití za sesterskou skupinu řádu veslonozí. Domníval se, že příbuznost mezi čeleděmi tohoto řádu byla způsobena konvergentní evolucí. Později Mayr (2005) uvedl, že fregatkovití, na rozdíl od předchozí studie, jsou blíže příbuzní terejovitým než pelikánovitým.

Hackett *et al.* (2008) klasifikovali pelikány jako sesterskou větev k člunozobci a kladivouši. Zástupci řádů veslonozí a brodiví se, na rozdíl od studie Mayra (2005), fylogeneticky vzájemně překrývali, nejbližší příbuznost anhingovitých, kormoránovitých a terejovitých však s Mayrem (2005) zůstala zachována. Čeled' faetonovití byla zcela vyřazena z těchto kladů.

Rozdělením řádů ve skupině Neoaves se zabývali Jarvis *et al.* (2014). Na základě analýzy celých genomů 48 ptačích druhů byla rozdělena tato skupina na dvě sesterské linie – Columbea a Passerea, ze které byly následně vyčleněny skupiny ptáků vodních (Aequornithia) a suchozemských (Telluraves). Do kladu Aequornithia autoři zařazují pelikány, volavky, ibise, kormorány, buňňáky (rod *Fulmarus*), tučňáky a potáplice; faetoni společně se slunatci byli zahrnuti do sesterské skupiny k tomuto kladu.

S výsledky studie Jarvise *et al.* (2014) se však příliš neztotožňovali Prum *et al.* (2015). Zpochybnili zejména malé množství analyzovaných vzorků odebraných ze 48 ptačích druhů, narozdíl od Prum *et al.* (2015), kteří provedli fylogenetickou analýzu 198 ptačích druhů ze 122 čeledí ve 40 řádech. Do skupiny Neoaves bylo zařazeno 5 kladů – Strisores, Columbaves, Gruiformes, Inopinaves a Aequirornithes, zahrnující všechny vodní ptáky mimo řád vrubozobí. Pelikáni tvoří s člunozubcem a kladivoušem sesterskou větev k zástupcům z čeledi volavkovití. Kormoráni a anhingy jsou nejpříbuznější terejům, dále i fregatkám. Společný předek této skupiny a pelikánů se datuje do období paleocénu (viz Obrázek č. 1, Prum *et al.*, 2015).



**Obrázek č. 1:** Schéma klasifikace kladu Aequirornithes (Prum *et al.*, 2015).

Z tradičního pojetí veslonohých byli pelikáni vyřazeni, zbytek čeledí z řádu veslonozí se nově označuje Suliformes (Gaisler *et Zima*, 2018).

### 3.2 Řád pelikáni

Zástupci řádu pelikáni patří mezi nejtěžší létající ptáky vůbec. Nohy jsou krátké, zadní prst směřuje dopředu a všechny prsty spojuje plovací blána, která tak umožňuje efektivní pádlování (Šťastný *et al.*, 1998). Dlouhá křídla s rozpětím až 345 cm jsou uzpůsobená pro výborné plachtění. Ocas je krátký a opeřený, u většiny druhů bílý s černě zbarvenými konci. V závislosti na druhu se hmotnost těla pohybuje od 4 do 13 kg. Zploštělý zobák, u pelikána bílého dlouhý až 47 cm, je spolu s roztažitelným vakem velmi

dobře uzpůsoben pro lovení ryb. Samci jsou většinou větší a těžší než samice, největší hmotnosti dosahují mláďata těsně před opeřením (del Hoyo *et al.*, 1992, Gosler, 1994).

Stejně jako ostatní vodní ptáci se pelikáni zdržují v blízkosti vody. Většina druhů preferuje sladkovodní oblasti, můžou se ovšem nacházet i v lagunách s brakickou vodou nebo ústí řek, méně často podél pobřeží. Pelikáni upřednostňují vyšší teploty tropických a teplých mírných pásem, mohou se však vyskytovat i v některých pouštních oblastech s velmi nízkými nočními teplotami. Vysoká teplota bývá regulována širokým otevřením koutků zobáku s následným roztažením a kmitáním krčního vaku. Další možností termoregulace je rozevření křídel, ačkoli je tento znak charakteristický zejména pro kormorány a anhingy (del Hoyo *et al.*, 1992).

### 3.2.1 Čeleď pelikánovití

Kennedy *et al.* (2013) rozdělují zástupce čeledi pelikánovití do tří kladů – první skupinu tvoří pelikán skvrnozobý (*Pelecanus philippensis*), kadeřavý (*P. crispus*), africký (*P. rufescens*) a australský (*P. conspicillatus*), druhou skupinu zahrnuje pelikán severoamerický (*P. erythrorhynchos*), hnědý (*P. occidentalis*) a chilský (*P. thagus*). Třetí skupinu tvoří pouze pelikán bílý (*P. onocrotalus*), který se příležitostně řadí ke skupině první.

Za jediného mořského pelikána je považován pelikán hnědý obývající břehy Tichého a Atlantského oceánu na americkém kontinentu. S menší velikostí pelikánů skvrnozobých a afrických souvisí i nižší nároky na potravu, které tak umožňují osídlování i menších vodních ploch (řeky, nádrže nebo rybníky) těmito druhy (del Hoyo *et al.*, 1992). Pelikáni loví zejména ryby, jejichž velikost se pohybuje od nejmenších ančoviček a sardinek vyskytujících se v hejnech až po kapry, štiky a okouny, některé druhy se živí i raky. Pelikáni severoameričtí upřednostňují ryby, které nejsou vyhledávány komerčními rybáři; mezi tyto ryby patří sladkovodní kapr a jelec a slanovodní menidie (*Menidia*) a menhaden (*Brevoortia*), tvořící v jihovýchodní USA až 95 % stravy pelikána hnědého. Pelikán hnědý a chilský loví tak, že v letu nad vodní hladinou vyhledávají kořist, za kterou se následně ze vzduchu potápějí. Při letu do vody hlava strmě směřuje dolů, křídla jsou držena ve tvaru „V“, hlava a krk jsou natáhnuty dopředu. Pták se může ponořit celý, ale díky podkožním vzduchovým vakům se zase rychle vrací na hladinu. Ostatní druhy, jež se při lovu nepotápějí, využívají pro zachycení kořisti své dlouhé krky a ústa. Morfologické adaptace jako pružné dolní čelisti a roztažitelné krční vaky tvořící chytací síť nemají funkci skladovací, nýbrž striktně kořistní. Tito ptáci se společně drží do

skupin ve tvaru podkovy po 8–12 jedincích, kteří následně usměřňují pohyb ryb do mělké vody. Postupem ke břehu rozevírají křídla a současně noří zobák pod hladinu. Tato technika koordinované predace je mezi ptáky velmi nevšední (del Hoyo *et al.*, 1992, Winkler *et al.*, 2015).

Pelikáni jsou monogamní, o mláďata se starají oba rodiče. Žijí v koloniích dosahujících i tisíce párů. Snášejí 1–6 vajec, ve většině případů pouze dvě (Winkler *et al.*, 2015). Vejce jsou oválná, krytá vápenatou skořápkou s namodralou, případně nažloutlou barvou. Hmotnost vajec se pohybuje od 120 do 195 g (del Hoyo *et al.*, 1992). Hnízdí na zemi nebo na stromech, samec většinou sbírá materiál, samice hnízdo staví (Gosler, 1994). Již první snesené vejce se začíná zahřívat, a proto se mláďata líhnou postupně. Inkubace trvá 30–36 dnů, v sezení na vejcích se po 24 h střídají oba rodiče. Vylíhlá mláďata jsou nidikolní, z počátku krmena řídkou směsí až třicetkrát denně, od dvou týdnů se již živí natrávenými rybami. Po cca 3 měsících jsou úplně opeřená, stávají se samostatnými a připojují se k rodičům na lov ryb. U druhů hnízdících na stromě rodiče postupně omezují mláďatům přísun potravy, čímž indukují jejich nedobrovolné opuštění hnízda. Pohlavní dospělosti dosahují ve 3–5 letech, v přírodě se dožívají až 25 let. Mezi mláďaty pelikána afrického běžně dochází k soupeření mezi sourozenci, kdy dříve vylíhlá mláďata vytlačují z hnízda mladší, případně jim odebírají příděl stravy, což vede k jejich následnému vyhladovění – tento způsob kompetice je typický i pro pelikána hnědého (del Hoyo *et al.*, 1992, Šťastný *et al.*, 1998).

### **3.2.2 Pelikán bílý**

Na rozdíl od ostatních druhů pelikánů má pelikán bílý červeně zbarvené nohy. V Evropě můžeme tento druh spatřit v Rumunsku, Bulharsku a na pobřeží Azovského moře (Hudec *et Hanzák*, 1974). Za potravou je schopen létat každodenně až 100 km. Hnízda pelikánů v Evropě a Asii se vyskytují většinou v rákosí, v Africe navíc i ve skalnatých oblastech (Šťastný *et al.*, 1998). Pelikán bílý patří mezi částečně stěhovavé ptáky, evropské populace migrují přes Turecko a oblasti středního východu do Afriky, zatímco populace pelikánů na africkém kontinentu své stanoviště nemění (del Hoyo *et al.*, 1992).



Na základě nejnovější klasifikace podle Gaisler *et Zima* (2018) se pelikán bílý řadí do systému následovně:

Říše: živočichové (Animalia)

Kmen: strunatci (Chordata)

Podkmen: obratlovci (Vertebrata)

Třída: ptáci (Aves)

Řád: pelikáni (Pelecaniformes)

Čeleď: pelikánovití (Pelecanidae)

Rod: pelikán (*Pelecanus*)

Druh: pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*)

### 3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity (Simple Sequence Repeats = SSRs) jsou krátké repetitivní sekvence s jednotkou repetice 1–6 nukleotidů, hojně se vyskytující v eukaryotických i prokaryotických genomech. Délka SSRs se pohybuje od dvaceti do několika stovek bází (Beckmann *et Weber*, 1992). Mutace v mikrosatelitních oblastech jsou velmi časté, z důvodu přítomnosti více alel se vyznačují vysokou heterozygotností (Barbará *et al.*, 2007, Tang *et al.*, 2008). Mikrosatelity jsou kodominantní, jejich variabilita se zjišťuje porovnáním jejich délky (Ellegren, 2004) nejčastěji pomocí PCR amplifikace (Primmer *et al.*, 1996). Vyskytují se jak v kódujících, tak i v nekódujících oblastech genomu. Výskyt v nekódujících oblastech, ve kterých mutace neovlivňuje fitness jedince, předurčuje fixaci alel v genomu a následný přenos do dalších generací (Ellegren, 2004). Díky jejich rozsáhlým variacím jsou velmi dobře využitelné při analýze jedinců stejného druhu (Schlötterer *et Tautz*, 1992). 30–70 % mikrosatelitů se vyskytuje v dinukleotidové formě, u obratlovců je nejběžnějším motivem (AC)<sub>n</sub> (Tóth *et al.*, 2000).

Největší nevýhodou mikrosatelitů je jejich nutná izolace *de novo* zvlášť pro každý druh. Důvodem je přítomnost mikrosatelitů v nekódujících oblastech, v nichž dochází k větší míře substituce nukleotidů než v oblastech kódujících. Z tohoto důvodu je navrhování „univerzálních“ primerů velmi problematické (Kocher *et al.*, 1989). Izolace nových mikrosatelitních lokusů je finančně a časově náročná, vyžaduje odbornou znalost a specializované laboratoře. Páry primerů pro amplifikaci pocházející z jiného druhu se označují jako heterologní, amplifikaci s těmito páry primerů značíme jako mezidruhovou, tzv. *cross-species* (Primmer *et al.*, 2005, Dawson *et al.*, 2010). Četnost mikrosatelitů

v genomu je u všech organismů přímo úměrná jeho velikosti (Hancock, 1996). Užití těchto *cross-species* mikrosatelitních markerů poskytuje informace o genetické struktuře sledované populace určitého druhu, uplatňují se rovněž při studiu mezidruhové příbuznosti nebo vývoje karyotypu a genomu (Primmer *et al.*, 1996, Dawson *et al.*, 2013).

Tóth *et al.* (2000) rozdělují mikrosatelity na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidy. Analýzou mikrosatelitů napříč různými systematickými jednotkami autoři zjistili, že výskyt poly(A/T) sekvence je v každém taxonu častější než sekvence poly(C/G). Rozdíl je nejvíce zřejmý u primátů, směrem k evolučně primitivnějším organismům se tento rozdíl stírá. Oliveira *et al.* (2006) dělí mikrosatelity podle motivu do čtyř skupin – na dokonalé, skládající se výhradně z jednoho motivu; nedokonalé, s vloženým párem bazí odlišujícím se od motivu; přerušené, pokud je do motivu vložena sekvence několika párů bazí a kombinované, složené z několika opakujících se motivů.

Polymorfismus je způsoben inzercí nebo delecí celých repetitivních motivů, jedinci se mezi sebou liší o jednotku repetice. Nejčastějšími příčinami vzniku těchto mutací je nerovnoměrná rekombinace a sklouznutí DNA polymerázy (*DNA slippage*) z templátového řetězce během replikace (Oliveira *et al.*, 2006). V buňce *Escherichia coli* dochází k takovému sklouznutí v jednom případě ze sta replikací (Schlötterer *et Tautz*, 1992). Jelikož jsou vysoce repetitivní oblasti citlivé na vznik mutací během DNA replikace, stabilita mikrosatelitů je zajištěna systémem MMR (*mismatch repair*) (Sia *et al.*, 1997). Ke sklouznutí DNA polymerázy dochází častěji u kratších repetitivních vláken než u delších. Vlákna s delší jednotkou repetice mají navíc větší šanci pro chybné spárování během *reannealingu* nově syntetizovaného vlákna (Eisen, 1999).

### 3.3.1 Mikrosatelity od druhů z řádu trubkonosí

Zástupci řádu trubkonosí (Procellariiformes) se dělí do čtyř čeledí – albatrosovití (Diomedidae) buňňákovití (Procellariidae), buňňáčkovití (Hydrobatidae) a buňňíkovití (Pelecanoididae). Laboratoř populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci disponuje 207 mikrosatelity pro čeledi albatrosovití, buňňákovití a buňňáčkovití. Pro čeleď buňňíkovití nebyl doposud popsán žádný mikrosatelit.

Dalších 5 mikrosatelitů pochází z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) od čeledí alkovití (Alcidae), kulíkovití (Charadriidae) a rackovití (Laridae) a 1 z řádu pěvci (Passeriformes) z čeledi lesňáčkovití (Parulidae); tyto mikrosatelity byly polymorfní u zástupců řádu trubkonosí.

### 3.3.1.1 Mikrosatelity od druhů z čeledi albatrosovití

Celkem 53 testovaných mikrosatelitů, popsaných v 5 člancích, bylo izolováno od 7 druhů z čeledi albatrosovití – albatrosa šedohlavého (*Diomedea chrysostoma*), stěhovavého (*D. exulans*), jižního (*D. gibsoni* a *D. antipodensis*), černobrvého (*Thalassarche melanophris*), laysanského (*Phoebastria immutabilis*), bělohřbetého (*P. albatrus*) a černonohého (*P. nigripes*).

Burg (1999) poprvé popsala 26 polymorfních mikrosatelitů izolovaných od **albatrosa šedohlavého** a **stěhovavého**. Genomická DNA byla naštěpena restriční endonukleázou *AluI*, fragmenty o velikosti 300–800 bp byly ligovány a transformovány do DH5a *Escherichia coli*. Inzerty v plazmidech byly hybridizovány se synteticky připravenými (AC)<sub>15</sub> oligonukleotidy a následně sekvencovány. Z původně navržených 31 párů primerů pro mikrosatelitní sekvence byl PCR produkt pouze u 26 z nich. Tyto mikrosatelity byly otestovány *cross-species* PCR amplifikací u albatrosa šedohlavého (*Diomedea chrysostoma*), stěhovavého (*D. exulans*) a černobrvého (*D. melanophris*). Devadesát jedinců albatrosa stěhovavého pocházelo z pěti různých skupin ostrovů – Crozetovy ostrovy, Adamsův a Aucklandův ostrov, ostrov prince Edwarda a Jižní Georgie. Polymorfismus vykazovalo 21 lokusů s 2–11 alelami. U jedinců albatrosa černobrvého a stěhovavého autoři našli po 15 polymorfních lokusech, 16 polymorfních lokusů bylo nalezeno u albatrosa šedohlavého. U albatrosa stěhovavého nedošlo k úspěšné amplifikaci mikrosatelitních lokusů Dc10 a Dc19. Na mikrosatelitním lokusu De33 s velmi dlouhou repetitivní sekvencí bylo u jedinců albatrosa stěhovavého pozorováno 11 alel, zatímco u obou dalších druhů byl tento lokus monomorfní.

Burg *et* Croxall (2001) analyzovali strukturu populace **albatrosa černobrvého**, **campbellského** a **šedohlavého** pomocí mikrosatelitů a mitochondriální DNA. Většina populací těchto druhů se vyskytuje na ostrovech v oblasti Jižního oceánu. Z odebraných vzorků krve byla pomocí chelexu vyizolována genomická DNA. Otestováním 37 mikrosatelitních lokusů bylo pro další analýzu použito sedm nejvariabilnějších lokusů – 6 již dříve popsaných podle Burg (1999) a nově popsaný De35. U 765 jedinců albatrosa černobrvého, respektive campbellského, bylo na mikrosatelitních lokusech detekováno 4–13 alel, u 756 jedinců albatrosa šedohlavého se vyskytovalo 5–22 alel.

Studiem fylogenetických a populačních struktur za účelem objasnění taxonomického zařazení vybraných druhů albatrosa se zabývali Burg *et* Croxall (2004). Z dospělých jedinců **albatrosa stěhovavého** (*Diomedea exulans*) a dalších dvou druhů,

česky shodně označovaných jako **albatros jižní** (*D. antipodensis* a *D. gibsoni*), žijících na sedmi skupinách ostrovů v Jižním oceánu, byly získány vzorky krve, z nichž byla použitím chelexu vyizolována genomická DNA. U 772 vzorků byly určeny genotypy na testovaných 9 mikrosatelitních lokusech – De3, Dc5, De11, Dc16, De18, Dc20, Dc27, De33 (Burg, 1999) a nově popsaném De37, který vykazoval u všech druhů největší polymorfismus s 6 a 7 alelami. Lokus De33 byl označen jako pohlavně vázaný a pro další analýzu vyloučen.

Dubois *et al.* (2005) popsali dalších deset polymorfních dinukleotidových mikrosatelitů u **albatrosa stěhovavého**. Z odebrané krve pomocí QIAmp Tissue Kitu (QIAGEN) vyizolovali DNA. Pro izolaci mikrosatelitních lokusů použili biotinem značené sondy a magnetické kuličky s navázaným streptavidinem. Celkově bylo vybráno 1248 klonů obsahujících mikrosatelity, z nichž 138 bylo vyhodnoceno jako vhodné pro sekvencování. Patnáct vybraných mikrosatelitních lokusů s největším počtem nepřerušovaných repetitivních sekvencí bylo poté otestováno na jedincích ve třech populacích. Polymorfismus vykazovalo 10 mikrosatelitních lokusů s 2–13 alelami. Tyto mikrosatelity byly následně *cross-species* PCR amplifikací otestovány na jedincích z čeledi buňákovití u buňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), šedého (*Calonectris diomedea*) a sněžního (*Pagodroma nivea*). U každého testovaného druhu bylo amplifikováno 8 lokusů, lokusy 6F12 a 7D8 se neamplifikovaly vůbec. U buňáka Bulwerova bylo detekováno 5 polymorfních lokusů a u buňáka sněžního 3 polymorfní lokusy. U buňáka šedého bylo všech 8 lokusů monomorfních. Počet alel u polymorfních lokusů autoři nevedli.

U tří ohrožených druhů albatrosů – **albatrosa černonohého**, **laysanského** a **bělohřbetého** charakterizovali Hernandez *et al.* (2014) 15 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Ze vzorků svalové tkáně 51 jedinců tří různých druhů albatrosů byla na DNeasy kitu (QIAGEN) vyizolována DNA, která byla následně rozštěpena. Sekvencováno bylo vždy prvních 250 bp od konce fragmentu směrem do jeho středu. Z těchto sekvencí byly vytvořeny genomové knihovny za použití NEBNext Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina a NEBNext Multiplex Oligos for Illumina. Při amplifikaci mikrosatelitních lokusů u 36 albatrosů černonohých (BFAL), 12 albatrosů laysanských (LAAL) a 3 albatrosů bělohřbetých (STAL) byla použita konstantní teplota *annealingu* 60 °C. Otestováním 16 párů primerů bylo detekováno 13 polymorfních lokusů u BFAL i LAAL, nejvíce alel bylo nalezeno na lokusu BFAL19 (18+13+5). Monomorfními

lokusy u všech tří druhů byly STAL8 a STAL12. Mikrosatelitní lokus STAL18 vykazoval polymorfismus se 7 alelami u albatrosa černonohého i laysanského, monomorfní produkt poskytla PCR amplifikace u albatrosa bělohřbetého – důvodem byl podle autorů pravděpodobně malý počet testovaných jedinců tohoto druhu (3).

### 3.3.1.2 Mikrosatelity od druhů z čeledi buřňáčkovití

Celkem 54 párů primerů bylo popsáno ve čtyřech článcích u tří druhů z čeledi buřňáčkovití – buřňáčka dlouhokřídlého (*Oceanodroma leucorhoa*), madeirského (*O. castro*) a Monteirova (*O. monteiroi*).

Sun *et al.* (2009) popsali deset nových mikrosatelitních lokusů u **buřňáčka madeirského** a **dlohokřídlého**. Genomická knihovna byla vytvořena ze zmrazených vzorků krve sedmi jedinců buřňáčka madeirského a dvou mražených vzorků tkání buřňáčka dlouhokřídlého. Autoři navrženými páry primerů testovali deset mikrosatelitních lokusů na 27 jedincích buřňáčka madeirského, 22 buřňáčcích Monteirových z Azorských ostrovů a 24 jedincích buřňáčka dlouhokřídlého z Norska. U každého druhu byl zjištěn polymorfismus alespoň na 6 lokusech s 2–11 alelami. *Cross-species* PCR amplifikací mikrosatelitních lokusů u buřňáčka galapážského (*Oceanodroma tethys*), límcového (*O. hornbyi*) a buřňáka tmavohřbetého (*Pterodroma phaeopygia*) se nepodařilo získat produkt na lokusech Oc64B a Oc79-2 u žádného z testovaných druhů. Největší polymorfismus mikrosatelitních lokusů autoři zaznamenali u buřňáka tmavohřbetého.

Celkem 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů Ole1–Ole26 u **buřňáčka dlouhokřídlého** našli Bicknell *et al.* (2011). Genomická DNA byla získána z krve metodou srážení s octanem amonným. Genomová knihovna byla obohacena o jednotky repetice (CT)<sub>n</sub>, (GTAA)<sub>n</sub>, (TTTC)<sub>n</sub> a (GATA)<sub>n</sub> navázanými na magnetické kuličky podle Glenn *et Schable* (2005). Z transformovaných bakterií autoři vyizolovali 211 mikrosatelitních sekvencí, pro 50 z nich byly navrženy páry primerů v softwaru Primer3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000), které byly otestovány na 4–6 nepříbuzných jedincích buřňáčka dlouhokřídlého. U 6 lokusů nedošlo k amplifikaci vůbec nebo vznikl nespecifický produkt, 26 lokusů bylo polymorfních a 18 monomorfních. Na jedincích bylo rovněž otestováno již dříve popsaných 47 primerů s velkou mezidruhovou přenosností (Dawson *et al.*, 2010). Polymorfní produkt poskytlo 15 lokusů, jejichž páry primerů byly izolovány z buřňáčka madeirského (Sun *et al.*, 2009) a zebříčky pestré (Sun *et al.*, 2009). Celkem 41 polymorfních lokusů bylo dále testováno na 24 jedincích

buřňáčka dlouhokřídlého (14 samců a 10 samic), u nichž se vyskytovaly ve 2–22 alelách. Fisherův exaktní test porovnávající počet homozygotů u samců a samic potvrdil vazbu mikrosatelitních lokusů Ol10-39, Ole12 a Ole26 na chromozom Z.

Bried *et al.* (2012) a Andris *et al.* (2012) popsali osmnáct nových mikrosatelitů u **buřňáčka Monteirova**, ohroženého endemita Azorských ostrovů. Velikost populace tohoto druhu se odhaduje na 250–300 párů. Pomocí QIAamp Tissue Kitu byla provedena izolace DNA. Variabilita byla otestována na 125 jedincích, z navržených 27 lokusů vykazovalo polymorfismus 18 z nich se 4 až 17 alelami. Všech 65 testovaných samic bylo na lokusu Omn23 homozygotních, čímž autoři předpokládají vazbu na chromozom Z. Následně byla provedena *cross-species* PCR amplifikace těchto mikrosatelitů u buřňáčka madeirského, buřňáka modravého a buřňáka Bulwerova. Detekce 17 polymorfních lokusů u buřňáčka madeirského potvrdila jeho úzkou příbuznost s buřňáčkem Monteirovým. U zbylých dvou testovaných druhů nedošlo u většiny lokusů k amplifikaci vůbec.

### 3.3.1.3 Mikrosatelity od druhů z čeledi buřňákovití

Z čeledi buřňákovití jsem testovala celkem 100 párů primerů, popsaných v 11 člancích, jenž byly izolovány od 9 druhů – buřňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), taiko (*Pterodroma magentae*), trinidadského (*P. arminjoniana*), havajského (*P. sandwichensis*), šedého (*Calonectris diomedea*), baleárského (*Puffinus mauretanicus*), světlonohého (*P. carneipes*), Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) a útlozobého (*Pachyptila belcheri*).

Šest polymorfních dinukleotidových mikrosatelitních lokusů izolovali a popsali Techow *et O'Ryan* (2004) u **buřňáka bělobradého**. DNA byla získána extrakcí z tkáně pomocí fenol-chloroformu a srážením s ethanolem, pro štěpení proteinů v roztoku byla použita proteináza K. Genomová knihovna vytvořená z DNA pěti jedinců byla obohacena o repetitivní sekvence (CA)<sub>n</sub>, na které byla aplikována DOP-PCR. Na biotinylované hybridizační sondy pro sledované (CA)<sub>n</sub> repetitivní sekvence PCR produktů se navázaly streptavidinové částice. Fragmenty s vloženými sekvencemi se klonovaly přes vektor Pomega pGEM-T-Easy. Po kultivaci na médiu s Ampicillinem a X-gal se vyseletovaly bílé kolonie bakterií, které se vysázely do mikrotitrační destičky s Ampicillinem-LA. Klony byly odebrány a přeneseny na blotovací Hybond N+ membránu (Amersham Pharmacia) a otestovány na přítomnost inzertu použitím CA sondy značené <sup>32</sup>P. V 21 rekombinantních plazmidech byly hledané mikrosatelity v 17 z nich. Pro 10 mikrosatelitů

s vhodnou ohraničující sekvencí DNA byly navrženy páry primerů v softwaru DNAMAN 4.13 (Lynnon BioSoft), které následně autoři otestovali u 68 jedinců buřňáka bělobradého. Polymorfismus vykazovalo šest lokusů s 3–9 alelami, zbývající byly monomorfní. Tyto mikrosatelity byly následně *cross-species* PCR amplifikací otestovány i na 5–6 jedincích buřňáka Hallova (*Macronectes hallis*), obrovského (*M. giganteus*) a tristanského (*Procellaria conspicillata*), albatrosa černobrvého (*Thalassarche melanophris*), šedohlavého (*T. chrysostoma*) a stěhovavého (*Diomedea exulans*). PCR amplifikace s navrženými páry primerů byla nejuspěšnější pro lokus Paequ2, autorům se podařilo amplifikovat tento lokus u všech testovaných druhů. Polymorfismus byl detekován u buřňáka tristanského, albatrosa černobrvého, šedohlavého a stěhovavého. Lokusy Paequ3 a Paequ10 vykazovaly polymorfismus u pěti druhů, u albatrosa stěhovavého se autorům nepodařilo tyto lokusy amplifikovat. Mikrosatelitní lokus Paequ4, který byl u všech jedinců buřňáka bělobradého monomorfní, poskytl polymorfní produkt u buřňáka Hallova a obrovského. Mikrosatelitní lokus Paequ7 vykazoval polymorfismus pouze u buřňáka tristanského a obrovského. U dvou druhů, buřňáka tristanského a albatrosa šedohlavého, byl polymorfní i lokus Paequ8. Na lokusu Paequ13 autoři detekovali polymorfismus u buřňáka tristanského a albatrosa černobrvého a šedohlavého, u zbývajících tří druhů nedošlo k PCR amplifikaci tohoto lokusu vůbec. Počty alel polymorfních lokusů nebyly autory uvedeny.

Dva polymorfní mikrosatelitní lokusy Tch6 a Tch25 popsala Lawrence (2008) u kriticky ohroženého **buřňáka taiko**. Mláďata této populace, čítající ve volné přírodě pouze 120–150 jedinců, se velmi často stávají kořistí exotických predátorů. Autorka se zabývala určením původu těchto jedinců, vzájemnou příbuzností a vyhledáváním dalších hnízd pro následné přemístění jejich potomků na chráněné, plotem ohraničené, území. Celkem od 145 jedinců byly postupně od října 1996 získány vzorky krve. Přítomnost inzertních mikrosatelitů s di-, tri- a tetranukleotidovými repeticemi značených <sup>32</sup>P byla zjištěna screeningem 2016 klonů, z nichž 178 klonů obsahovalo 99 mikrosatelitů. Pouze pro 9 oblastí s vhodnou sekvencí byly v programu Primer3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000) navrženy páry primerů. PCR amplifikace proběhla úspěšně na 4 lokusech, z nichž tři poskytly polymorfní produkt. Dva z těchto lokusů však byla následně z analýzy odebrány, jelikož na prvním lokusu byl polymorfismus způsoben přítomností nulových alel, v druhém případě se jednalo o unikátní inzerci a delecii v dané oblasti; jediným polymorfním lokusem tak zůstal lokus Tch6 s dvěma alelami. Autorka dále navrhla pro 9 mikrosatelitních oblastí páry primerů podle Hamilton *et al.* (1999), u nichž došlo

k amplifikaci 6 lokusů, přičemž polymorfní byl pouze lokus Tch25 se 4 alelami. Na 142–143 jedincích buřňáka taiko bylo následně otestováno 22 párů primerů pro mikrosatelitní lokusy izolované z jiných ptačích druhů. Po vyřazení mikrosatelitu De33, u kterého byla zjištěna vazba na pohlavní chromozom, byl polymorfismus detekován na pěti mikrosatelitních lokusech s 2 až 9 alelami.

Pro monitorování populace **buřňáka šedého** na Azorských ostrovech popsali Bried *et al.* (2008) 11 dinukleotidových mikrosatelitů. Genomickou DNA izolovali z krve pomocí QIAmp Tissue Kitu (QIAGEN), použitím mikrosatelitních sond značených biotinem, magnetických kuliček se streptavidinem a XL10 Gold ultrakompetentních bakterií provedli izolaci mikrosatelitních lokusů podle Dubois *et al.* (2005). Celkem 262 klonů bylo analyzováno pomocí sekvenátoru ABI 3100 (Applied Biosystems), pro 15 lokusů s největším počtem nepřerušovaných sekvencí byly navrženy páry primerů. Variabilita testovaná na 43 jedincích byla zjištěna na 11 lokusech s 2 až 8 alelami. Lokus Cd4 byl u všech 24 samic detekován pouze v homozygotní formě, s největší pravděpodobností se jedná o lokus vázaný na chromozom Z. *Cross-species* PCR amplifikací lokusů Cd1–Cd11 na 6 jedincích albatrosa stěhovavého, buřňáka bělobradého a buřňáka Bulwerova byl zjištěn polymorfismus na 9 lokusech, zbývající lokusy Cd4 a Cd5 byly u všech druhů monomorfní, případně nedošlo k amplifikaci vůbec.

Šest mikrosatelitních lokusů Parm01–Parm06 popsali Brown *et al.* (2009) za účelem zjištění původu a struktury populace **buřňáků trinidadských** na ostrově Round Island. Vzorky byly odebrány z tří mrtvých mláďat a uchovány ve 100% ethanolu při okolní teplotě. Genomickou DNA autoři vyizolovali podle Sambrook *et al.* (1989) užitím fenol-chloroformu. Genomická knihovna byla obohacena o (CA)<sub>n</sub> a (CAGA)<sub>n</sub> repetic. Následně byly podle Lunt *et al.* (1999) vyselektovány pozitivní klony s inzertem obsahující (CA)<sub>n</sub> a (CAGA)<sub>n</sub> sekvence. Páry primerů navržené v programu Primer3 (Rozen *et al.* Skaletsky, 2000) byly otestovány na 260 jedincích z Round Island v Indickém oceánu a 80 jedincích z ostrova Trindade v jižním Atlantském oceánu. Ze 43 testovaných lokusů byly polymorfní pouze tři lokusy Parm01–Parm03 se 4 až 10 alelami, další tři lokusy Parm04–Parm06 byly monomorfní. Autoři však detekovali polymorfismus u těchto lokusů při následné *cross-species* PCR amplifikaci na 125 jedincích sedmnácti druhů z řádu trubkonosí a 8 jedincích tučňáka žltorohého. Na jedincích buřňáka trinidadského bylo rovněž *cross-species* PCR amplifikací otestováno 53 párů primerů již dříve navržených pro buřňáka bělobradého, kulíka mořského a albatrosa stěhovavého



a šedohlavého. Polymorfni PCR produkt poskytlo 6 lokusů – De11 (Burg, 1999), Paequ3, Paequ13 (Techow *et al.*, 2004), 10C5, 12H8 (Dubois *et al.*, 2005) a Calex-01 (Küpper *et al.*, 2007).

Pro sledování genetické diverzity, struktury populace a případného křížení s příbuzným buňákem středomořským popsali Gonzalez *et al.* (2009) deset mikrosatelitních lokusů u **buňáka baleárského**, kriticky ohroženého endemita Baleárských ostrovů. Genomové knihovny byly obohaceny o (CA)<sub>n</sub> a (AAAG)<sub>n</sub> repetitivní sekvence. Pro naštěpení genomické DNA, izolované z tkáně za použití fenol-chloroformu a proteinázy K, byly použity restriční enzymy *RsaI* a *XmnI* (New England Biolabs). Pozitivní transformované kolonie byly chemiluminiscenčně detekovány v CDP-Star kitu (Sigma) a pro 23 mikrosatelitů byly navrženy páry primerů. Polymorfismus byl sledován u 55 jedinců na dvou různých lokalitách Baleárských ostrovů – na ostrovech Cabrera a Ibiza. Jen 10 lokusů vykazovalo polymorfni charakter se 2 až 10 alelami. Největší počet alel zaznamenali na lokusu Puff Sma6, k jehož amplifikaci došlo pouze u samic. Následná amplifikace genů CDH1, která dala PCR produkt pouze u samic, potvrdila lokalizaci tohoto mikrosatelitu na pohlavním chromozomu W. Na 23 jedincích blízce příbuzného buňáka středomořského autoři provedli *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů, monomorfni produkt dal pouze lokus Puff G2F, největší variabilita byla zaznamenána na lokusu Puff G11F s 9 alelami.

Jedenáct polymorfni mikrosatelitních lokusů u **buňáka Bulwerova** poprvé popsali Andris *et al.* (2010 a 2012). Ze vzorků krve užitím QIAamp Tissue Kitu (QIAGEN) vyextrahovali genomickou DNA. Z knihovny obohacené o (TG)<sub>10</sub> a (TC)<sub>10</sub> pomocí oligonukleotidových sond značených biotinem, streptavidinových kuliček a kompetentních bakterií (Promega) byly podle Dubois *et al.* (2005) vyizolovány mikrosatelitní lokusy. Osekvencováním rekombinantních klonů byly pro 25 lokusů navrženy páry primerů, které byly otestovány na 91 dospělých jedincích. Polymorfismus byl detekován na 24 lokusech, avšak kvůli problémům při amplifikaci a nedostatku heterozygotů na některých lokusech bylo pro další testování vybráno pouze 11 lokusů, u nichž bylo nalezeno 2 až 8 alel. Amplifikací lokusu Bb11 byla zjištěna homozygotnost u všech 44 testovaných samic, což dokazuje pravděpodobnou vazbu na pohlavní chromozom Z. Mikrosatelitní páry primerů autoři následně testovali *cross-species* PCR amplifikací na pěti jedincích každého druhu u buňáka bělobradého, modravého

a buňňáčka Monteirova. Pouze lokusy Bb11 a Bb22 vykazovaly polymorfni produkt u všech tří druhů, počty alel autoři neuvodli.

Welch *et* Fleischer (2011) popsali 10 nových polymorfni mikrosatelitních lokusů u ohroženého **buňňáka havajského**. Genomická DNA byla extrahována ze vzorků tkáně jednoho samce a jedné samice. Po naštěpení genomické DNA byly fragmenty velké 200–1000 bp spojeny SNX linkery a amplifikovány. Následně došlo k obohacení těchto fragmentů o mikrosatelitní oligonukleotidové repetice (CA)<sub>10</sub>, (AAAG)<sub>5</sub>, (AAAC)<sub>5</sub> a (AGAGG)<sub>5</sub>. Po opětovné amplifikaci a ligaci byly vloženy přes pBluescript II SK do plazmidů a přeneseny do ultrakompetentních bakterií *Escherichia coli*. Po oscreenování přibližně 1400 transformovaných kolonií autoři vybrali 65 unikátních sekvencí s vhodnou oblastí, pro které navrhli páry primerů v softwaru Primer3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Na 15 jedincích bylo celkem otestováno 54 nově vytvořených párů primerů a 37 párů primerů již dříve publikovaných z řádu trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci (Dawson *et al.*, 1997, Burg, 1999, Given *et al.*, 2002, Techow *et* O’Ryan, 2004, Friesen *et al.*, 2006, Bried *et al.*, 2008, Gonzalez *et al.*, 2008, Brown *et* Jordan, 2009). Z 54 *de novo* izolovaných mikrosatelitních lokusů bylo vyhodnoceno 10 jako polymorfni s 3–10 alelami, stejný počet polymorfni lokusů byl i v případě *cross-species* PCR amplifikace, kde se počet alel pohyboval od 3 do 14.

Dalších sedm mikrosatelitních lokusů Patbel1–Patbel7 popsali Quillfeldt *et al.* (2012) pro studium mimopárové paternity u **buňňáka útlozobého**. Genomická DNA byla vyextrahována za použití DNeasy Tissue Kitu (QIAGEN) z peří a krve, jež byla odebrána 43 dospělým jedincům a 33 mládčatům. Podle Klauke *et al.* (2009) byla provedena PCR amplifikace, izolace mikrosatelitů a klonování. Mikrosatelitní lokus Patbel2 vykazoval 16 alel, u ostatních testovaných lokusů se počet pohyboval v rozmezí 5–10 alel. Alely lokusu Patbel5 byly u všech samic nalezeny pouze v homozygotním stavu, u samců se vyskytovaly heterozygotně, čímž je předpokládána vazba tohoto mikrosatelitního lokusu na pohlavní chromozom Z.

Pro lokalizaci oblastí hnízdění v australské rybářské oblasti popsali Hardesty *et al.* (2013) jedenáct polymorfni lokusů u **buňňáka světloňého**. Tento druh se vyskytuje na ostrovech jižní polokoule poblíž Austrálie a na ostrově Kauwahaia u Nového Zélandu, vlivem hojného rybolovu v této oblasti četnost této populace neustále klesá. Genomická DNA byla rozštěpena užitím restrikčních enzymů *RsaI*, *HaeIII*, *BsrB1*, *PvuII*, *StuI*, *ScaI* a *EcoRV*. Na získané fragmenty s tupými konci byly navázány biotinylované magnetické

kuličky, pomocí kterých byla následně sestavena genomová knihovna s obohacenými repeticemi (AAC)<sub>12</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CATC)<sub>8</sub> a (TAGA)<sub>8</sub>. Amplifikované molekuly byly pro odstranění adaptérů rozštěpeny restrikcí enzymem *HindIII* a výsledné fragmenty vloženy do klonovacího místa plazmidu pUC19. Pozitivní klony obsahující mikrosatelity byly následně analyzovány pomocí sekvenátoru ABI 377. Z krve a peří byla pro testování polymorfismu extrahována genomická DNA tří populací buřňáka světlonohého z Nového Jižního Walesu, Západní Austrálie a Nového Zélandu a třinácti ptáků neznámého původu chycených při rybolovu. Otestováním 84 jedinců bylo nalezeno 11 polymorfních lokusů se 3–11 alelami.

Moodley *et al.* (2015) zkoumali genetickou strukturu různých populací **buřňáka útlozobého**. Pro tyto účely popsali 25 polymorfních mikrosatelitních lokusů Pacbel\_00386–Pacbel\_20784 s 5 až 48 alelami. Genomická DNA byla extrahována z krve, brků peří a svalové tkáně pomocí DNeasy Tissue Kitu (QIAGEN) a rozštěpena na 300–800bp fragmenty, které byly následně vloženy do ssDNA knihovny. Fragmenty byly následně obohaceny o tandemově repetitivní sekvence s magnetickými streptavidinovými kuličkami a biotinem značené (CT)<sub>n</sub> a (GT)<sub>n</sub> repetitivní oligonukleotidy. Knihovna byla osekvcována technologií Roche 454 GS-FLX, pro jejíž výsledné sekvence byly navrženy páry primerů. Otestováním 36 párů primerů *cross-species* PCR amplifikací u čtyř nepříbuzných jedinců buřňáka útlozobého a tří jedinců buřňáka holubího bylo nalezeno 26 polymorfních lokusů. Jeden z lokalizovaných lokusů Pacbel\_00829 byl zjištěn ve významné vazbě s lokusem Pacbel\_03731 a lokusem Pacbel\_08509, proto byl z analýzy autory vyřazen. Autoři následně otestovali polymorfismus na 77 jedincích buřňáka útlozobého napříč ostrovy Kergueleny, Falklandy a Isla Noir v jižním Chile. Největší polymorfismus byl zaznamenán na lokusu Pacbel\_03731, na kterém bylo u 74 jedinců zjištěno 48 alel. Následným testováním těchto mikrosatelitů *cross-species* PCR amplifikací u buřňáka holubího (*Pachyptila desolata*), širokozobého (*P. vittata*), hrdliččího (*P. turtur*), Salvinova (*P. salvini*), modravého (*Halobaena caerulea*) a buřňáčka Wilsonova (*Oceanites oceanicus*) autoři zjistili největší polymorfismus na lokusu Pacbel\_03731, který vykazoval u 75 jedinců buřňáka holubího 51 alel.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál byl pro analýzu získán zaměstnanci Zoologické zahrady Dvůr Králové. Z krve odebrané 6 nepříbuzným jedincům pelikána bílého byla vedoucím bakalářské práce vyizolována DNA užitím fenol-chloroformové metody. Koncentrace izolované DNA byla ředěním upravena na 10–50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### 4.2 PCR amplifikace DNA pelikána bílého

PCR amplifikace byla provedena na genomické DNA 6 jedinců pelikána bílého. Podle Tabulky č. 1 byla připravena PCR reakční směs pro 6 vzorků, do každého PCR mixu byl přidán jeden pár primerů pro amplifikaci mikrosatelitního lokusu.

**Tabulka č. 1:** Složení PCR mixu pro 6 vzorků.

Složka PCR reakční směsi	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
Deionizovaná voda	44,4
Reakční pufr (10x)	6,7
Roztok $\text{MgCl}_2$ ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	4,0
Roztok dNTPs ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0,7
Primer F ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	3,3
Primer R ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza ( $5\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ )	1,0

Všechny reagentie byly rozmrazeny, zvortexovány a zcentrifugovány. Do 1,5ml mikrozkmavek byly napipetovány složky PCR reakční směsi a zvortexovány. Do 0,2ml mikrozkmavek bylo napipetováno po 1  $\mu\text{l}$  genomické DNA pelikána bílého, do každé z nich bylo následně přidáno 9  $\mu\text{l}$  připravené PCR reakční směsi. Mikrozkmavky byly vloženy do termocykleru s nastavenými časovými a teplotními podmínkami znázorněnými ve Schématu č. 1.

**Schéma č. 1:** Časové a teplotní podmínky PCR reakce.

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

Podle výše popsaného schématu byla provedena počáteční reakce s každým párem primerů, kdy teplota *annealingu* primerů byla nastavena na 50 °C. Při dalším opakování

byla individuálně podle potřeby upravena pro jednotlivé mikrosatelity na základě předchozího testování.

Ke *cross-species* PCR amplifikaci bylo použito celkem 213 párů primerů. 207 párů primerů bylo navrženo pro PCR amplifikaci mikrosatelitů pro zástupce z řádu trubkonosí (Procellariiformes), dalších 5 pro zástupce řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) a 1 pro lesňáčka žlutohého z řádu pěvci (Passeriformes). Amplifikací vybraných mikrosatelitů z řádu dlouhokřídlí a pěvci byl zjištěn polymorfismus u zástupců z řádu trubkonosí, proto byly zařazeny do testování. Seznam všech použitých mikrosatelitů je uveden v Tabulce č. 2 a 3.

**Tabulka č. 2:** Seznam mikrosatelitů izolovaných od zástupců druhů z řádu trubkonosí, které byly testovány na polymorfismus u jedinců pelikána bílého.

Čeď	Zdrojový druh	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
albatrosovití ( <i>Diomedidae</i> )	albatros stěhovavý ( <i>Diomedea exulans</i> )	7D8, 12C8, 11H7, 10C5, 11H1, 6A3, 12H8, 11F3, 6F12, 12E1	Dubois <i>et al.</i> , 2005
		De1, De2, De3, De7, De11, De12, De17, De18, De25, De30, De33	Burg, 1999
	albatros šedohlavý ( <i>D. chrysostoma</i> )	Dc5, Dc9, Dc10, Dc16, Dc19, Dc20, Dc21, Dc22, Dc26, Dc27, Dc31	
	albatros šedohlavý, albatros stěhovavý	D6, D24, D2, D32	
	albatros jižní ( <i>D. gibsoni</i> a <i>D. antipodensis</i> ), albatros stěhovavý	De37	Burg <i>et</i> Croxall, 2004
	albatros černobrvý ( <i>Thalassarche melanophris</i> ), albatros šedohlavý	De35	Burg <i>et</i> Croxall, 2001
	albatros laysanský ( <i>Phoebastria immutabilis</i> )	LAAL1, LAAL7, LAAL10, LAAL19	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
	albatros bělohřbetý ( <i>P. albatrus</i> )	STAL4, STAL8, STAL12, STAL18, STAL20, STAL24	
	albatros černonohý ( <i>P. nigripes</i> )	BFAL4, BFAL11, BFAL14, BFAL19, BFAL20	

**Tabulka č. 2:** Pokračování 1.

Čeď	Zdrojový druh	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
buňňákovití ( <i>Procellariidae</i> )	buňňák bělobradý ( <i>Procellaria aequinoctialis</i> )	Paequ2, Paequ3, Paequ4, Paequ7, Paequ8, Paequ10, Paequ13	Techow <i>et</i> O’Ryan, 2004
	buňňák taiko ( <i>Pterodroma magentae</i> )	Tch6, Tch25	Lawrence, 2008
	buňňák trinidatský ( <i>P. arminjoniana</i> )	Parm01, Parm02, Parm03, Parm04, Parm05, Parm06	Brown <i>et</i> Jordan, 2009
	buňňák havajský ( <i>P. sandwichensis</i> )	Ptero01, Ptero02, Ptero03, Ptero04, Ptero05, Ptero06, Ptero07, Ptero08, Ptero09, Ptero10	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011
	buňňák šedý ( <i>Calonectris diomedea</i> )	Cd1, Cd2, Cd3, Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd10, Cd11	Bried <i>et al.</i> , 2008
	buňňák baleárský ( <i>Puffinus mauretanicus</i> )	Puff 1.5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2C, Puff G2F, Puff G11F, Puff PM2, Puff Sma6	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
	buňňák světlonohý ( <i>P. carneipes</i> )	Pc A105, Pc A107, Pc A115, Pc B11, Pc B109, Pc B115, Pc C104, Pc D3, Pc D103, Pc D109, Pc D121	Hardesty <i>et al.</i> , 2013
	buňňák Bulwerův ( <i>Bulweria bulwerii</i> )	Bb2, Bb3, Bb7, Bb10, Bb11, Bb12, Bb20, Bb21, Bb22, Bb23, Bb25	Andris <i>et al.</i> , 2010 a 2012
	buňňák útlozobý ( <i>Pachyptila belcheri</i> )	Patbel1, Patbel2, Patbel3, Patbel4, Patbel5, Patbel6, Patbel7	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012
Pacbel_00386, Pacbel_02653, Pacbel_03731, Pacbel_04240, Pacbel_04355, Pacbel_04991, Pacbel_07265, Pacbel_08509, Pacbel_08867, Pacbel_08988, Pacbel_09021, Pacbel_09528, Pacbel_09957, Pacbel_10033, Pacbel_10895, Pacbel_12344, Pacbel_15293, Pacbel_15327, Pacbel_16671, Pacbel_16989, Pacbel_17529, Pacbel_17944, Pacbel_17986, Pacbel_19907, Pacbel_20784		Moodley <i>et al.</i> , 2015	

**Tabulka č. 2:** Pokračování 2.

Čeleď	Zdrojový druh	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
buřňáčkovití ( <i>Hydrobatidae</i> )	buřňáček dlouhokřídlý ( <i>Oceanodroma leucorhoa</i> )	Ole01, Ole02, Ole03, Ole04, Ole05, Ole06, Ole07, Ole08, Ole09, Ole10, Ole11, Ole12, Ole13, Ole14, Ole15, Ole16, Ole17, Ole18, Ole19, Ole20, Ole21, Ole22, Ole23, Ole24, Ole25, Ole26 OI10-39	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
	buřňáček madeirský ( <i>O. castro</i> )	Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B	Sun <i>et al.</i> , 2009
	buřňáček Monteirův ( <i>O. monteiroi</i> )	Omn1, Omn2, Omn3, Omn4, Omn6, Omn7, Omn8, Omn11, Omn14, Omn15, Omn16, Omn17, Omn21, Omn22, Omn23, Omn24, Omn25, Omn28	Bried <i>et al.</i> , 2012 a Andris <i>et al.</i> , 2012

**Tabulka č. 3:** Seznam mikrosatelitů izolovaných od zástupců druhů z řádu dlouhokřídlí a pěvců, které byly testovány na polymorfismus u jedinců pelikána bílého.

Řád	Čeleď	Zdrojový druh	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
dlouhokřídlí	alkovití	alkoun obecný ( <i>Cepphus guillemots</i> )	Cco5-21	Friesen <i>et al.</i> , 2006
	kulíkovití	kulík mořský ( <i>Charadrius alexandrinus</i> )	Calex-01	Brown <i>et al.</i> , 2009 podle Küpper <i>et al.</i> , 2007
	rackovití	racek novozélandský ( <i>Larus novaehollandiae scopulinus</i> )	RBG18, RBG18M, RBG29	Lawrence, 2008, Welch <i>et al.</i> , 2011 podle Given <i>et al.</i> , 2002
pěvců	lesňáčkovití	lesňáček žlutohý ( <i>Dendroica petechia</i> )	Dpm01	Friesen <i>et al.</i> , 2006 podle Dawson <i>et al.</i> , 1997

### 4.3 Zpracování PCR produktů elektroforetickou separací

Uvedený postup je navržen pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra. Rozměry skel jsou 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťka gelu činí 0,4 mm.

1. Plochu velkého i malého skla důkladně omýt vodou a saponátem za použití kartáčku. Plochu obou skel opláchnout deionizovanou vodou, ošetřit dvakrát 96% ethanolem a osušit papírovým ubrouskem.
2. Na plochu malého skla nanést 1 ml molekulárního lepidla, papírovým ubrouskem roztok rozetřít, klást důraz na okraje ošetřované plochy. Po zaschnutí (5 min) ošetřit povrch skla čtyřikrát 96% ethanolem.
3. Plochu velkého skla ošetřit přípravkem Rain-off pro odpuzování vody, který následně papírovým ubrouskem rozetřít po celé ploše skla. Po zaschnutí (5 min) opláchnout deionizovanou vodou a opět osušit ubrouskem.
4. Na polystyrenovou podložku v digestoři položit velké sklo ošetřenou plochou nahoru. Na kraje delších stran umístit dva spacersy o tloušťce 4 mm. Na spacersy položit malé sklo ošetřenou plochou dolů. Hrany skel srovnat k sobě tak, aby na jedné kratší straně byly v zákrytu, na opačné straně by delší sklo mělo přechýlat cca o 2,5 cm. Skla sepnout dvěma klipsy na obou stranách.
5. V kádince si připravit polyakrylamidový gel, a ten následně nalít do mezery mezi skly po celé jejich šířce, přičemž rukou poklepávat na sklo, aby se předešlo vzniku vzduchových bublin v gelu.
6. Do gelem vyplněného prostoru zasunout mezi skla rovnou stranou hřebínek tak, aby byl cca 5 mm hluboko, v místě hřebínku sepnout skla čtyřmi klipsy a nechat gel hodinu tuhnout.
7. Po ztuhnutí gelu skla odklipsovat, omýt vodou, kartáčkem odstranit přebytečný gel v okolí hřebínku a osušit papírovou utěrkou.
8. Skla vložit do elektroforetické komůrky tak, aby malé sklo bylo v kontaktu s hliníkovou deskou komůrky. Katodový prostor zalít 0,5 x TBE pufrem, po kontrole zda jsou skla dostatečně uchycena a pufr neprotéká, zalít i anodový prostor a vytáhnout hřebínek.
9. Injekční stříkačkou a plastovou špachtlí odstranit mezi skly přebytečný gel a vzduchové bubliny. Ke zdroji stejnosměrného napětí připojit elektrody, nastavit



hodnotu výkonu na 90 W, napětí na 3000 V a proud na 150 mA. Gel za těchto podmínek nechat nahřívat 30 minut.

10. Během této doby si připravit vzorky. Ke každému PCR produktu přidat 5  $\mu$ l nanášecího pufru, takto přichystané vzorky cca 5 min před nanášením do gelu vložit do termocykleru a nechat denaturovat. Po 3 minutách vzorky ihned přenést do ledové tříště, aby se zabránilo renaturaci denaturovaných vláken DNA produktů.
11. Vypnout zdroj napětí, odpojit katodu, otevřít katodový prostor a injekční stříkačkou a špachtlí odstranit zbytek polyakrylamidového gelu a rozpuštěné močoviny. Hřebínek vsunout do gelu asi 1 mm hluboko tak, aby se předešlo ulomení zoubků.
12. Osmikanálovou pipetou nanést po 2  $\mu$ l vzorku do mezer hřebínku, po nanesení všech vzorků uzavřít katodový prostor, připojit ke zdroji napětí a nastavit hodnotu výkonu na 70 W, napětí na 3 000 V a proud na 150 mA.
13. V závislosti na molekulové hmotnosti trvá elektroforetická separace 1,5–3 hod, rychlost separace lze orientačně sledovat na základě barviv obsažených v nanášecím pufru.
14. Po uplynutí doby elektroforetické separace vypnout zdroj elektrického napětí, odpojit elektrody, šroubem uvolnit kanálek pro průtok pufru z katodového prostoru. Uvolnit úchytky skel, skla vyjmout a umístit na vodorovnou podložku. Odstranit spacery a čepelí nože oddělit skla od sebe.
15. Sklo s gelem směřujícím nahoru přenést do fotomisky na třepačku v digestoři, gel zalít fix/stop roztokem a nechat působit alespoň 20 min.
16. Po této době slít roztok zpět do baňky a misku s gelem promýt 3x deionizovanou vodou. Do misky nalít roztok 1%  $\text{HNO}_3$  a měřit čas 4 min.
17. Roztok vylít a gel promýt 4x deionizovanou vodou. Do roztoku 0,1%  $\text{AgNO}_3$  přidat 1,2 ml formaldehydu, a takto připraveným roztokem zalít fotomisku s gelem a nechat min 30 min působit.
18. Do baňky s vývojkou (vychlazený uhličitan sodný) přidat 1,2 ml formaldehydu a 140  $\mu$ l thiosíranu sodného.
19. Roztok 0,1%  $\text{AgNO}_3$  slít zpět do zásobní lahve a gel opláchnout v deionizované vodě po dobu 5 vteřin. Sklo s gelem přemístit do další misky, ten následně zalít roztokem s vývojkou. Postupně dochází k vyvíjení hnědočerných pruhů PCR produktů. Vyvíjení zastavit přidáním fix/stop roztoku a nechat působit asi 2 min.
20. Sklo s gelem ponořit do misky s deionizovanou vodou, nechat okapat a přenést do sušárny, gel schne 30 min při teplotě 90 °C.

21. Usušený gel vyhodnotit na negatoskopu a naskenovat.
22. Gel ze skla odstranit ponořením do roztoku NaOH o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro opětovné použití sklo omýt saponátem a kartáčkem.

#### 4.4 Použité chemikálie

- akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza ( $5\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), M1241 (Promega)
- bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $400 \mu\text{l}$  každého), U1240 (Promega)
- deionizovaná voda
- dusičnan stříbrný (Sigma)
- ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- ethylendiamintetraoctan sodný -  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Lachner)
- formaldehyd (Lachner)
- formamid (Lachner)
- hydroxid sodný (Lachner)
- chlorid sodný (Lachema)
- kyselina boritá (Lachner)
- kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- kyselina octová (Lachner)
- 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- močovina (Lachner)
- N, N' - methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin - TEMED (AppliChem)
- peroxodisíran amonný (Lachner)
- Rain-off - tekuté stěračce (Sheron)
- thiosíran sodný (Lachema)
- trishydroxymethylaminomethan - Tris (AppliChem)
- uhličitan sodný (Lachner)
- xylenová modř - Xylencyanol FF (AppliChem)

#### 4.5 Použité roztoky

Akrylamid, 6% zásobní roztok:

- 50 ml 10x TBE

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid: N, N'-metylenbisakrylamid 19:1
- všechny složky rozpustit, zfiltrvat a uchovat v tmavé lahvi v chladničce

Dusičnan stříbrný, 0,1%:

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

Fix/stop roztok:

- 88 ml ledové kyseliny octové
- 800 ml deionizované vody

Hydroxid sodný, 1 mol·l<sup>-1</sup>:

- 40 g hydroxidu sodného
- doplnit deionizovanou vodou na 1 000 ml

Kyselina dusičná, 1% roztok:

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

Molekulární lepidlo:

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

Nanášecí pufr:

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

Peroxodisíran amonný, 10% roztok:

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

Polyakrylamidový gel, 6% roztok:

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400 μl 10% roztoku peroxodisíranu amonného

- 40  $\mu\text{l}$  N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu

#### Reakční pufr pro PCR, 10x:

- 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu
- 80 ml deionizované vody
- upravit pH pomocí HCl na hodnotu 9,0
- 3,73 g KCl
- 1 ml Triton X-100
- rozpustit a doplnit do 100 ml

#### TBE pufr, 10x zásobní roztok:

- 55 g kyseliny borité
- 108 g trishydroxymethylaminomethanu
- 40 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 8,0
- deionizovanou vodou doplnit do 1 000 ml

#### Vývojka:

- 24 g uhličitanu sodného
- 800 deionizované vody
- uložit do chladničky
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu\text{l}$  thiosíranu sodného

### **4.6 Laboratorní přístroje**

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiquette - 0,5–10  $\mu\text{l}$  (osmikanálová) a 0,3  $\mu\text{l}$ –1 ml (Thermolab Systems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu\text{l}$ –1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)

- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler TP XP (BIOER)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

## 5 Výsledky

V rámci experimentální části jsem otestováním 213 párů primerů metodou *cross-species* PCR amplifikace zjišťovala polymorfismus mikrosatelitních lokusů na 6 nepříbuzných jedincích pelikána bílého. Pro každý nalezený polymorfní lokus byla určena teplota *annealingu* při PCR reakci, doba elektroforetické separace, případně koncentrace hořčičných iontů v PCR mixu.

Z celkově testovaných 213 mikrosatelitů pocházelo 207 z řádu trubkonosí – 53 od zástupců z čeledi albatrosovití, 100 od zástupců z čeledi buňňákovití a 54 od zástupců z čeledi buňňáčkovití. Zbývajících 6 mikrosatelitů pocházelo od čtyř zástupců řádů dlouhokřídlí a pěvci, tyto mikrosatelity byly polymorfní u některého zástupce z řádu trubkonosí. Z řádu dlouhokřídlí pocházely 3 mikrosatelity od racka novozélandského, 1 od kulíka mořského a 1 od alkouna obecného. Poslední mikrosatelit pocházel od lesňáčka žlutohého z řádu pěvci.

PCR testy všech párů primerů proběhly nejprve při teplotě *annealingu* 50 °C. V případě poskytnutí velmi slabého, případně žádného produktu byla teplota postupně snižována na 44 °C. Pokud byl naopak produkt velmi tmavý, špatně hodnotitelný, teplota se zvyšovala na 69 °C. Pro lepší vizualizaci jednotlivých alel a určení genotypů jedinců byla elektroforetická separace prodloužena z 90 až na 180 minut nebo byla upravena koncentrace hořčičných iontů v PCR mixu z původní koncentrace na třičtvrtěnní hodnotu  $1,2 \text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , čehož bylo docíleno snížením objemu pipetovaného roztoku  $\text{MgCl}_2$  a o stejnou hodnotu navýšením objemu vody, aby byl zachován celkový objem PCR reakce.

Z 213 testovaných mikrosatelitů poskytlo polymorfní lokus 46 párů primerů. Polymorfních produktů je ale o jeden víc, protože jeden pár primerů (Dc5) poskytl dva polymorfní lokusy. Čtyři páry primerů ani opakovaně při snižované teplotě až na 44 °C neposkytly žádný produkt, zbytek testovaných primerů poskytl produkt monomorfní. Nalezené polymorfní mikrosatelitní lokusy jsou uvedeny v Tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4:** Charakteristika 46 polymorfních mikrosatelitů, které byly testovány na 6 nepříbuzných jedincích pelikána bílého. V tabulce je uveden název mikrosatelitního lokusu s kódem z databáze GenBank, zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel (N), teplota *annealingu* (T<sub>A</sub>) a čas elektroforetické separace (ELFO). Hvězdička (\*) znázorňuje použití tříčtvrteční koncentrace hořčnatých iontů v PCR mixu.

Název lokusu (GenBank Acc. no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	N	T <sub>A</sub> [°C]	ELFO [min]
7D8 (AY945757)	albatros stěhovavý	F: CACGCTGCACTTTGTGATTT R: ACACGGTTTGATTCCTCTGC	GA	2	62	120
11H1 (AY945752)		F: ACCGGAGCACCAAAATACCT R: CCGGTATTGACCCAGAGAGA	GT/GA	2	62	90
Dc5* (AF096790)	albatros šedohlavý	F: AGGAGGGAACTTCTCCCAG R: AGCAGGGAGTGACTIONGAGGAG	AC/CAC	2 + 3	51	90
D24 (AF096804)	albatros šedohlavý a stěhovavý	F: AGCCTGCTTTTGATGGAAGC R: CACTCTATTTTCTCCAGCTGA	CA	2	67	90
Dc31 (AF096810)	albatros šedohlavý	F: CTGACTCTCTGGGATGAGCC R: GTACCCCTGGAAAGCCAGAC	GC/AN/AC/AG	2	56	90
De35 (nevedeno)	albatros černobrvý a šedohlavý	F: CAAACCTGAAACCTTCCAAAAC R: CCCCCTGTTTCTACTCTGGTC	nevedeno	2	61	90
BFAL4 (nevedeno)	albatros černonohý	F: TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R: GTTTGCCATTTTAAACTGTCATTGGC	TC	2	65	90
LAAL19 (nevedeno)	albatros laysanský	F: ATGACCAGTGCCATCAACAG R: TGGCCAGATGTGATTTGAAG	ATCC	3	65	90
Paequ2 (AY371070)	buňák bělobradý	F: GCCTACTCCATCTTAATTGTG R: GGTTCATACAGTTTCTTAGGTC	CA	2	57	90

Tabulka č. 4: Pokračování 1.

Název lokusu (GenBank Acc. no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repeticce	N	T <sub>A</sub> [°C]	ELFO [min]
Paequ3 (AY371071)	buňák bělobradý	F: TGTGGGTGCAGTAGAGCA R: CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	GA	3	66	120
Paequ8 (AY371074)		F: TATTCTGAGACTTGC GTTATCC R: GTGATCCATTAGTTGATGTCTACTG	CA	2	58	120
Tch6 (neuveдено)	buňák taiko	F: GTTTCTTGGTGGTGGCTGAAGGTGTATG R: GCCATTTGAGAATGTTTCAGC	GT/GC	2	52	90
Cd1 (EU029083)	buňák šedý	F: CAAGCAGTCAGAACTCTGTG R: TGAGTTTGCCCTACATGAAC	TG/TC	4	66	90
Cd2 (EU029084)		F: CAACAACCTCACCCTGCCTTT R: GCTCCTTTCTGAAGCTGTGG	TG/CG	2	53	90
Cd3 (EU029085)		F: TTGCCTCTTTTACAGGACTGC R: TCCCTGTGGCTAAGGATCTG	GT/CT	3	58	90
Cd4 (EU029086)		F: AAAGCTTTAAGCAGCGTTCC R: AAGAGAAGCCAACATTGTGAAA	CA	2	63	150
Cd5 (EU029087)		F: CTGCACAGACTGAGAGTATAAGATTC R: GGCTTAAAGGGTAAATACACATGG	GT/AT	2	63	120
Cd6 (EU029088)		F: GAGAGGAAAAAGCGTTAGGG R: TGCTGCAGTTACTGATTGGA	AC	2	58	90
Parm02 (EU360818)	buňák trinidatský	F: AGCAAGCTGACAGCAACAGA R: TGTTATGTCCTGCGGATGAG	CA	3	67	120
Puff 1.5 (EU158894)	buňák baleárský	F: AGGCAGCAACATAGTCAC R: GCACTGATAAGGGA ACTT	GT	2	55	90



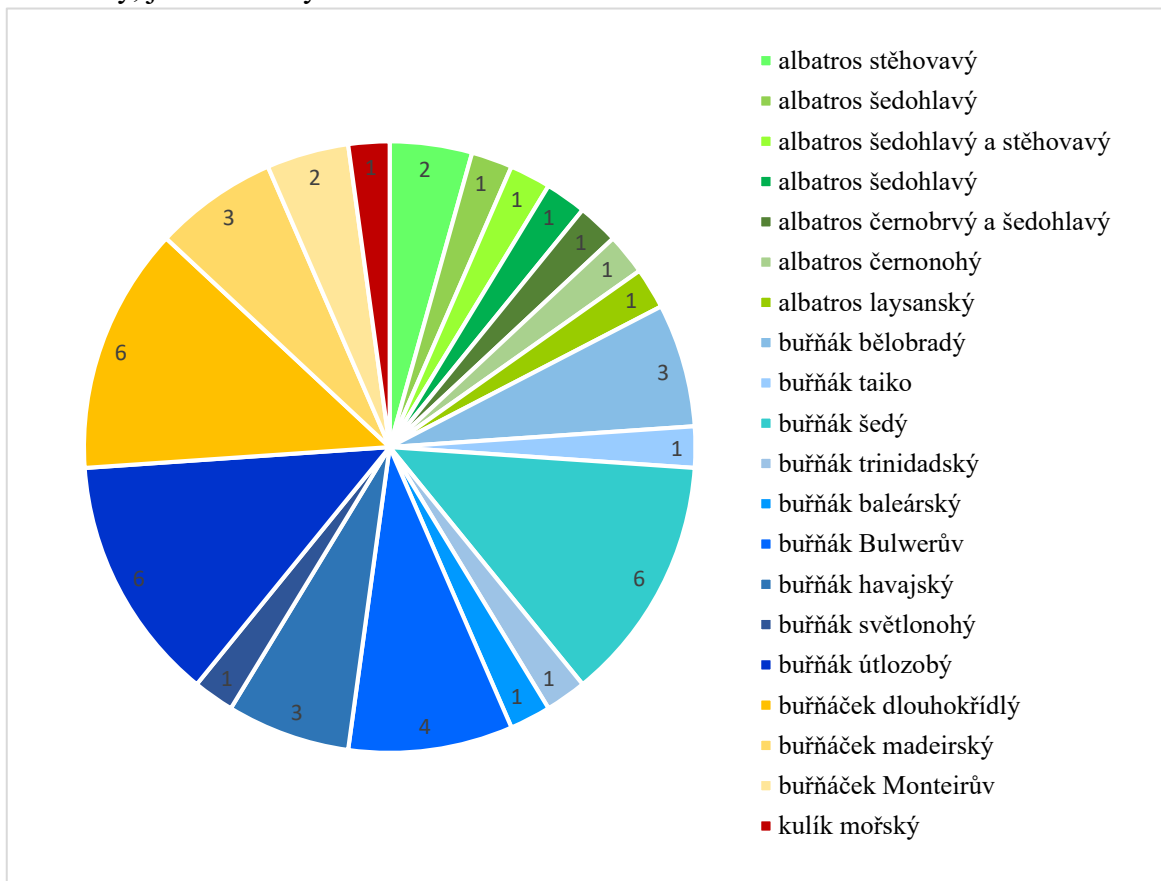
Tabulka č. 4: Pokračování 2.

Název lokusu (GenBank Acc. no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repeticce	N	T <sub>A</sub> [°C]	ELFO [min]
Ptero04 (HQ918221)	buňňák havajský	F: TGCATTGTTTCTGTCCAAACTC R: GGCTGGAATGCATAGTACCAAC	CA	3	60	90
Ptero06 (HQ918223)		F: GTTCCATGGCGATGAAGG R: CTGAAAATGGCATCCAAACG	AAGG	2	48	90
Ptero09 (HQ918226)		F: GCAAATACCAGTCTTCCAAAGG R: TTTAAGATAAAGATGTTTGAGAACCAC	AAGG	5	60	90
Pc B109 (JX435475)	buňňák světloňohý	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATTCAGGATGTAGGTTC	CAA	3	65	120
Patbel2 (JF288776)	buňňák útlozobý	F: GGTGTCATGCAACTGACTGAA R: CAATGGGAATGGCAGAGACT	CTAT	4	65	90
Patbel3 (JF288777)		F: CCTTCCCTAGAGCAATGGAG R: TGCACACACTGAAAGAGGACA	CTAT	6	62	90
Patbel6 (JF288790)		F: TGAGTGGGTGGAATTGAACA R: AATGGTTTGGGCACACTTCT	CTAT	2	53	90
Pacbel_08867 (nevedeno)		F: TTTGGTCAATTTTCCCTCGC R: ACAGAAAACCAATGTTGTTAATAGG	GA	2	55	90
Pacbel_10895 (nevedeno)		F: AGCTTTCTGTCTGGTAGCAC R: TGCTCCTGCCTAAGCTACG	AC/AT	2	47	90
Pacbel_15327 (nevedeno)		F: TTCTTGTAGCAGTAGGAGACC R: ACCTCATGTGTA AACCTGCC	CA	2	55	90
Ole01 (FR696377)		buňňáček dlouhokřídľý	F: CACCCTGAATCCCAGAACCAAGC R: TCAGTGAAGGTCCACTCCGAATCC	ACAG	2	58

Tabulka č. 4: Pokračování 3.

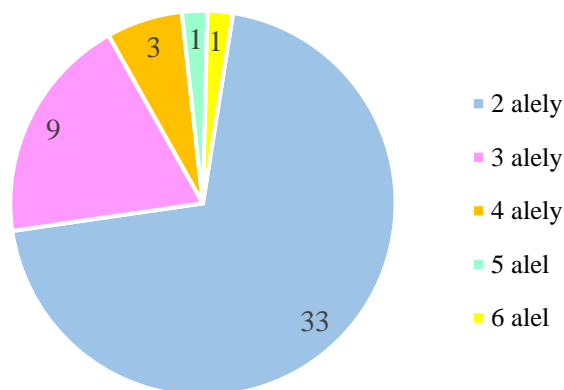
Název lokusu (GenBank Acc. no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repeticce	N	T <sub>A</sub> [°C]	ELFO [min]
Ole01 (FR696377)	buřňáček dlouhokřídlý	F: CACCCTGAATCCCAGAACCAAGC R: TCAGTGAAGGTCCACTCCGAATCC	ACAG	2	58	90
Ole09 (FR696385)		F: GGCCTGGATTCTGCGTGTTGGG R: CAGCTACAGGCCACGGGTGC	CA	2	66	90
Ole13 (FR696389)		F: GGGCCAGACATGTATTTACTGGAGGG R: GTGCATCCGAGAGCCGACGC	TG	2	51	120
Ole19 (FR696395)		F: GAAGGCTCTCAAGGGTCAAG R: TTTGGGAGAAGTTCAGTAGAAGAAC	GA/CA	2	60	90
Ole25 (FR696401)		F: CCTCCTCATCGTAGGGACTG R: TTAAAGGCAGCGATTCTGTTC	AGAT/GAAA	2	64	90
Ole26 (FR696402)		F: TCAGCTTCTGGTGCAGTTATG R: TCCTGCTGATGGATAGGTTATG	TG	2	53	90
Oc28B (FJ238097)		buřňáček madeirský	F: GCGTTGACCAGCAAATAGTC R: GGAAGGCTACCACAATTTCA	TG	3	54
Oc79 (FJ238102)	F: TATTCCTGGCCATGTTTTCC R: GCTTCCTTTGTTTCAGTTTAGA		AC	2	52	90
Oc84 (FJ238103)	F: CCTTTTTCCAGGCAGACAAA R: AGTTCAAGGGCAACCTTGTG		AG	2	62	90
Omn3 (JQ303228)	buřňáček Monteirův	F: GCGCTTGAAAGGGTGAAGTA R: TCCCATCTGAGATTTAAGGAAGA	AC/GT	2	64	180
Omn8 (JQ303232)		F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTA	AC	4	63	90
Calex-01 (AM072445)	kulík mořský	F: CTTCTCCATTGTTGTCACCTCCAGT R: CTTGACTTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT/GA/GC	2	69	90

Z celkově testovaných 213 mikrosatelitů byl zjištěn polymorfismus u 46 z nich, což znamená úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitu 21,6 %. Z 46 polymorfních mikrosatelitů bylo 45 izolováno od zástupců z řádu trubkonosí a 1 od kulíka mořského z čeledi kulíkovití. Největší úspěšnost pro nalezení polymorfního lokusu vykazovala čeleď buňákovití, ze 100 testovaných bylo 26 polymorfních, úspěšnost tedy činila 26,0 %. V rámci této čeledi byla zároveň zjištěna i největší úspěšnost polymorfismu v rámci druhu, kdy z 11 testovaných lokusů izolovaných od buňáka šedého bylo 6 polymorfních u pelikána bílého. Z čeledi buňáčkovití vykazovalo polymorfismus 11 lokusů, úspěšnost tedy byla 20,4 %. Nejmenší úspěšnosti bylo dosaženo při *cross-species* PCR amplifikaci lokusů z čeledi albatrosovití, která činila pouze 15,1 %. Přehled polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého podle čeledí a druhů, ze kterých byly izolovány, jsou uvedeny na Obrázku č. 2.



**Obrázek č. 2:** Graf rozdělení 46 polymorfních mikrosatelitních lokusů podle čeledí a druhů, ze kterých byly původně izolovány. Zeleně jsou značeny druhy z čeledi albatrosovití, modře z čeledi buňákovití, oranžově z čeledi buňáčkovití a červeně z čeledi kulíkovití. Číslem je vyjádřen počet nalezených mikrosatelitů.

Z hlediska počtu alel zjištěných u 46 párů primerů jsem u 32 mikrosatelitních lokusů detekovala dvě alely, u 8 lokusů tři alely, u 3 lokusů čtyři alely, u 1 lokusu pět alel a u 1 lokusu šest alel. Páry primerů pro amplifikaci mikrosatelitního lokusu Dc5 poskytly dvě polymorfní oblasti. První oblast měla dvě alely, druhá tři alely. Na Obrázku č. 3 jsou znázorněny obě tyto oblasti.



**Obrázek č. 3:** Graf rozdělení 47 mikrosatelitů podle počtu alel amplifikovaných 46 páry primerů, odvozených od zástupců z řádu trubkonosí a dlouhokřídli, které poskytly *cross-species* PCR amplifikací polymorfní produkt. Číslem je vyjádřen nalezený počet alel u těchto mikrosatelitů testovaných u pelikána bílého.

*Cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů byla otestována na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého, pro každý polymorfní lokus byly určeny genotypy těchto jedinců znázorněné v Tabulce č. 5.

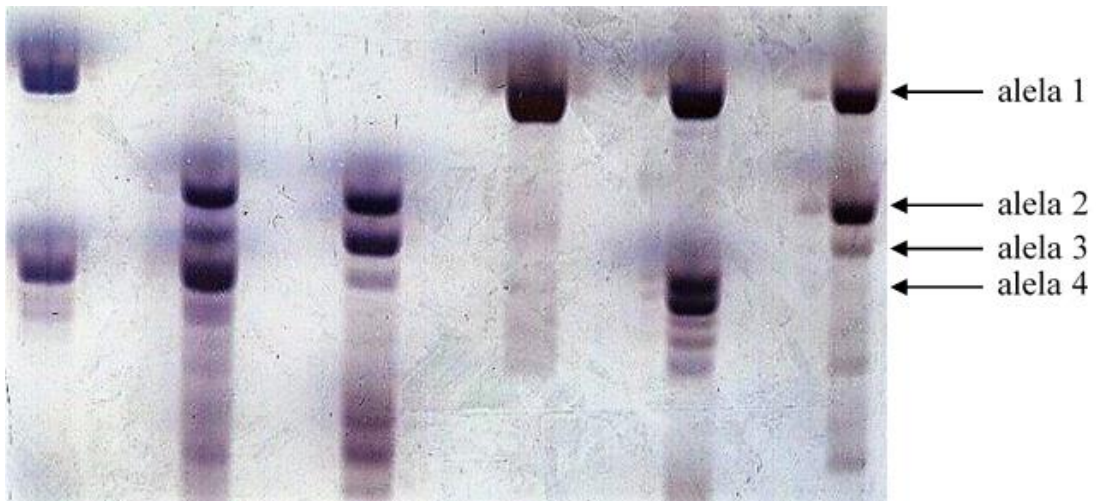
**Tabulka č. 5:** Genotypy 47 polymorfních mikrosatelitních lokusů získaných *cross-species* PCR amplifikací s 46 páry primerů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. V tabulce je uveden mikrosatelitní lokus, zdrojový druh, počet alel a genotypy jedinců. U lokusu Ole09 jsou znázorněny nulové alely.

Mikrosatelitní lokus	Zdrojový druh	Počet alel	Genotypy
7D8	albatros stěhovavý	2	$1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/2$
11H1		2	$1/2$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$
Dc5	albatros šedohlavý	2 + 3	$1/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$ $1/1$ $2/2$
			$3/3$ $1/3$ $2/2$ $3/3$ $2/2$ $1/2$
D24	albatros šedohlavý a stěhovavý	2	$1/2$ $1/2$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/2$
Dc31	albatros šedohlavý	2	$1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/2$
De35	albatros černobrvý a šedohlavý	2	$2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
BFAL4	albatros černonohý	2	$2/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/1$

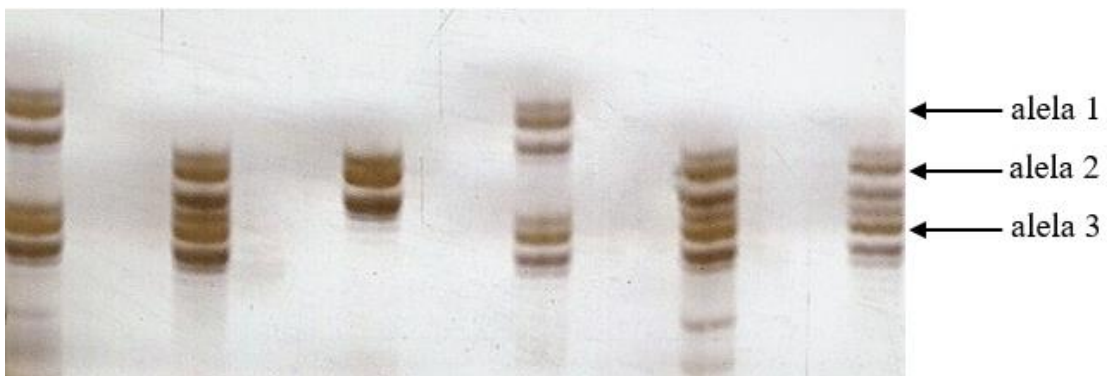
**Tabulka č. 5:** Pokračování.

<b>Mikrosatelitní lokus</b>	<b>Zdrojový druh</b>	<b>Počet alel</b>	<b>Genotypy</b>
LAAL19	albatros laysanský	3	$2/3$ $3/3$ $2/2$ $2/3$ $3/3$ $1/1$
Paequ2	buřňák bělobradý	2	$2/2$ $1/1$ $1/1$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
Paequ3		3	$1/1$ $1/3$ $1/1$ $1/2$ $1/3$ $1/3$
Paequ8		2	$1/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
Tch6		buřňák taiko	2
Cd1	buřňák šedý	4	$1/4$ $2/4$ $2/3$ $1/1$ $1/4$ $1/2$
Cd2		2	$1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$
Cd3		3	$1/3$ $2/3$ $2/2$ $1/3$ $2/3$ $2/3$
Cd4		2	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$
Cd5		2	$1/1$ $1/2$ $2/2$ $1/1$ $2/2$ $1/2$
Cd6		2	$2/2$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/2$
Parm02	buřňák trinidadský	3	$2/3$ $1/2$ $2/2$ $2/3$ $1/1$ $1/1$
Puff 1.5	buřňák baleárský	2	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$
Bb3	buřňák Bulwerův	2	$1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/2$
Bb20		2	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$
Bb21		2	$1/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
Bb25		3	$2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/3$ $2/2$
Ptero04		buřňák havajský	3
Ptero06	2		$1/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
Ptero09	5		$1/4$ $2/5$ $3/4$ $1/4$ $2/5$ $4/4$
Pc B109	buřňák světlonohý	3	$3/3$ $1/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$ $1/3$
Patbel2	buřňák útlozobý	4	$2/3$ $1/4$ $4/4$ $2/3$ $1/3$ $1/3$
Patbel3		6	$1/6$ $1/6$ $4/5$ $2/3$ $1/6$ $1/6$
Patbel6		2	$2/2$ $1/2$ $2/2$ $1/2$ $1/1$ $1/1$
Pacbel_08867		2	$2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
Pacbel_10895		2	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
Pacbel_15327		2	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$ $1/2$
Ole01		buřňáček dlouhokřídlý	2
Ole09	2		$2/2$ - $2/2$ $1/2$ - $1/2$
Ole13	2		$1/1$ $2/2$ $1/2$ $1/1$ $2/2$ $2/2$
Ole19	2		$1/1$ $1/2$ $2/2$ $1/1$ $1/2$ $1/2$
Ole25	2		$1/2$ $1/1$ $2/2$ $2/2$ $1/1$ $1/1$
Ole26	2		$1/1$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
Oc28B	buřňáček madeirský		3
Oc79		2	$2/2$ $1/1$ $2/2$ $2/2$ $1/1$ $1/1$
Oc84		2	$2/2$ $2/2$ $1/1$ $1/2$ $1/2$ $1/2$
Omn3	buřňáček Monteirův	2	$1/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$
Omn8		4	$2/3$ $1/2$ $1/4$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
Calex-01	kulík mořský	2	$1/1$ $1/1$ $2/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$

Na následujících fotografiích jsou znázorněny výsledky elektroforetické separace PCR produktu po provedené *cross-species* PCR amplifikaci lokusu Cd1 (viz Obrázek č. 4) a Cd3 (viz Obrázek č. 5).



**Obrázek č. 4:** Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Cd1 testovaného na šesti nepříbuzných jedincích pelikána bílého. Na obrázku jsou šipkami vyznačeny 4 alely, které byly detekovány při  $T_A$  66 °C.



**Obrázek č. 5:** Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Cd3 testovaného na šesti nepříbuzných jedincích pelikána bílého. Na obrázku jsou šipkami vyznačeny 3 alely, které byly detekovány při  $T_A$  58 °C.

## 6 Diskuze

V této bakalářské práci jsem *cross-species* PCR amplifikací testovala 213 párů primerů pro mikrosatelitní oblasti, z nichž 207 bylo izolováno z řádu trubkonosí. Pět mikrosatelitů pocházejících z řádu dlouhokřídlí a jeden z řádu pěvci byly vyhodnoceny jako polymorfní u některého zástupce z řádu trubkonosí, a proto byly do testování rovněž zahrnuty. U šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého vykazovalo polymorfismus 47 mikrosatelitních lokusů amplifikovaných 46 páry primerů. 163 mikrosatelitních lokusů bylo monomorfních. V případě neposkytnutí PCR produktu byla PCR opakována a teplota *annealingu* optimalizována, případně byly přemíchány páry primerů, přesto se u 4 lokusů nepodařilo získat žádný PCR produkt.

Pro čeled' albatrosovití bylo navrženo 53 párů primerů, se kterými jsem po *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého detekovala 9 polymorfních lokusů, přičemž jeden pár primerů (Dc5) amplifikoval dvě polymorfní oblasti. Dva z těchto polymorfních lokusů pocházely od albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*) a šedohlavého (*D. chrysostoma*) a jeden společný byl popsán pro oba tyto druhy. U albatrosa černonohého (*Phoebastria nigripes*) a laysanského (*P. immutabilis*) bylo nalezeno po jednom polymorfním lokusu. Poslední lokus vykazující polymorfismus byl izolován od albatrosa černobrvého (*Thalassarche melanophris*) a šedohlavého.

Deset polymorfních mikrosatelitů u albatrosa stěhovavého charakterizovali Dubois *et al.* (2005). Při teplotě *annealingu* 58 °C u mikrosatelitu 7D8 našli autoři dvě alely, stejně jako já při teplotě  $T_A$  62 °C. Při stejné  $T_A$  jsem u mikrosatelitu 11H1 detekovala 2 alely, autoři při  $T_A$  58 °C otestováním 20 jedinců zjistili 13 alel.

Burg (1999) popsala 26 mikrosatelitních lokusů u albatrosa šedohlavého a stěhovavého. PCR amplifikace zahrnovala dvě teploty *annealingu* – 7 cyklů při teplotě  $T_{A1}$  a 25 cyklů při teplotě  $T_{A2}$ . Autorka amplifikací lokusu Dc5 u 50 jedinců albatrosa šedohlavého užitím  $T_A$  46 °C a 48 °C našla 4 alely. Já jsem při teplotě *annealingu* 51 °C a upravenou koncentrací hořčnatých iontů v PCR mixu (1,2 nmol·dm<sup>-3</sup>) detekovala dvě oblasti polymorfismu s dvěma a třemi alelami. U lokusu D24 jsem, na rozdíl od autorky, při  $T_A$  67 °C našla 2 alely. Autorka provedením PCR při  $T_A$  48 °C a 52 °C získala u všech jedinců albatrosa stěhovavého, šedohlavého a černobrvého monomorfní produkt. *Cross-species* PCR amplifikací lokusu Dc31 za stejných podmínek PCR reakce získala

opět monomorfní produkt u všech tří druhů albatrosů, já jsem užitím  $T_A$  56 °C nalezla dvě alely.

O dva roky později se ve své studii Burg *et* Croxall (2001) zabývali otázkou příbuzenství druhů albatrosů a jejich geografickým rozšířením na šesti ostrovech, respektive souostrovích v subantarktické oblasti. Amplifikací lokusu De35 užitím PCR s  $T_A$  48 °C a 52 °C autoři detekovali, v závislosti na ostrově, 7–12 alel, já jsem při  $T_A$  61 °C nalezla alely dvě.

Pro albatrosy bělohřbeté, černonohé a laysanské žijící v severním Pacifiku popsali Hernandez *et al.* (2014) 15 mikrosatelitů. Otestováním 36 jedinců albatrosa černonohého při  $T_A$  60 °C autoři detekovali 8 alel, já jsem užitím  $T_A$  65 °C nalezla pouze 2 alely. Při stejné teplotě *annealingu* jsem u mikrosatelitu LAAL19 nalezla tři alely, autoři u 12 jedinců albatrosa laysanského našli při  $T_A$  60 °C 6 alel.

Pro čeled' buňňákovití bylo navrženo 100 párů primerů, se kterými jsem po provedení *cross-species* PCR amplifikace nalezla 26 polymorfních lokusů: po jednom lokusu izolovaném od buňňáka taiko (*Pterodroma magentae*), trinidadského (*P. arminjoniana*), baleárského (*Puffinus mauretanicus*) a světlonohého (*P. carneipes*), po třech lokusech izolovaných od buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*) a havajského (*Pterodroma sandwichensis*) a po šesti lokusech odvozených od buňňáka šedého (*Calonectris diomedea*) a útlozobého (*Pachyptila belcheri*). Čtyři polymorfní lokusy byly izolovány od buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*).

Techow *et* O'Ryan (2004) izolovali u buňňáka bělobradého šest polymorfních mikrosatelitních lokusů. Pro lokus Paequ2 zjistili při  $T_A$  54 °C u 94 jedinců 4 alely, já jsem při  $T_A$  57 °C nalezla pouze dvě alely. Polymorfismus u 6 jedinců pelikána bílého vykazoval i lokus Paequ3, u kterého jsem nalezla při  $T_A$  66 °C 3 alely. Autoři amplifikací tohoto lokusu u 93 jedinců a užitím  $T_A$  55 °C detekovali alel devět. Na lokusu Paequ8 byly při  $T_A$  58 °C autory popsány 3 alely, při stejné  $T_A$  jsem nalezla o jednu alelu méně. Páry primerů navržené pro lokusy Paequ3 a Paequ8 otestovala Lawrence (2008) při *cross-species* PCR amplifikaci DNA 143 jedinců buňňáka taiko, u kterých nalezla devět, respektive dvě alely.

Lawrence (2008) se zabývala studiem kriticky ohroženého buňňáka taiko na Chathamských ostrovech východně od Nového Zélandu. Popsala dva mikrosatelitní markery, z nichž u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého vykazoval polymorfismus



lokus Tch6. Dvě alely jsem našla při  $T_A$  52 °C, stejný počet alel při  $T_A$  57 °C popsala i autorka.

Jedenáct dinukleotidových mikrosatelitů Cd1–Cd11 u buřňáka šedého charakterizovali Bried *et al.* (2008). Všechny lokusy autoři amplifikovali u 43 jedinců při  $T_A$  58 °C, u pelikána bílého vykazovalo polymorfismus šest lokusů Cd1–Cd6. Při stejné teplotě jsem našla 3 alely u lokusu Cd3 a 2 alely u lokusu Cd6, autoři u těchto lokusů popsali 5 alel. U obou lokusů Cd4 a Cd5 jsem při teplotě *annealingu* 63 °C detekovala dvě alely, autoři lokus Cd4 lokalizovali na pohlavní chromozom Z. Při *cross-species* PCR amplifikaci u šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého se však tento předpoklad nepotvrdil. Amplifikací lokusu Cd5 autoři našli 6 alel, stejný počet alel zaznamenali i u lokusu Cd1, u kterého jsem při  $T_A$  66 °C detekovala o dvě alely méně. U lokusu Cd2 bylo popsáno 5 alel, já našla pouze dvě při  $T_A$  53 °C.

Brown *et al.* (2009) izolovali u buřňáka trinidadského šest polymorfních lokusů. Pouze lokus Parm02 vykazoval polymorfismus u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého, u nichž jsem popsala 3 alely s  $T_A$  67 °C, zatímco u zdrojového druhu byly popsány alely čtyři s  $T_A$  55 °C. Autoři tyto mikrosatelity otestovali u 17 druhů z řádu trubkonosí a tučňáka žltorohého. Počet testovaných jedinců každého druhu byl velmi variabilní, u 8 jedinců tučňáka žltorohého na lokusu Parm02 autoři detekovali 5 alel. U čtyř zástupců řádu trubkonosí byly na tomto lokusu popsány 2–3 alely.

Deset polymorfních lokusů bylo popsáno u ohroženého buřňáka baleárského. Za jediný polymorfní lokus jsem určila Puff 1.5 s dvěma alelami při  $T_A$  55 °C. Stejný počet alel zaznamenali Gonzalez *et al.* (2009) u 54 jedinců s  $T_A$  nižší o 1 °C.

Andris *et al.* (2010 a 2012) charakterizovali 11 mikrosatelitů u buřňáka Bulwerova. Čtyři mikrosatelity jsem zaznamenala jako polymorfní i u pelikána bílého. U dvou lokusů Bb3 a Bb21 jsem při  $T_A$  59 °C a 62 °C detekovala po dvou alelách, autoři užitím  $T_A$  58 °C pro všechny lokusy našli v obou případech o alelu více. Dvě alely jsem rovněž pozorovala u lokusu Bb20 s  $T_A$  49 °C, u kterého bylo autory popsáno sedm alel. Šest alel bylo zaznamenáno na lokusu Bb25 u buřňáka Bulwerova, já jsem amplifikací tohoto lokusu u pelikána bílého s  $T_A$  66 °C získala alely tři. Následné *cross-species* testování pěti jedinců buřňáka bělobradého, modravého a buřňáčka Monteirova ukázalo největší příbuznost buřňáka Bulwerova s buřňákem modravým, u kterého autoři našli deset polymorfních lokusů. U buřňáčka Monteirova se neamplifikovaly lokusy Bb2 a Bb21, u jedinců buřňáka bělobradého byla úspěšná amplifikace všech lokusů.

Deset mikrosatelitních lokusů Ptero01–Ptero10 popsali ve své studii Welch *et al.* (2011) zabývající se buňňákem havajským, endemitem Havajských ostrovů. Otestováním 40 jedinců autoři našli pro lokus Ptero04 při  $T_A$  53 °C 8 alel, já jsem našla 3 alely při  $T_A$  60 °C. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého vykazoval polymorfismus při  $T_A$  48 °C rovněž lokus Ptero06 s dvěma alelami, u něhož autoři při  $T_A$  53 °C detekovali alel devět. Při stejné teplotě *annealingu* u lokusu Ptero09 popsali 7 alel, já jsem při  $T_A$  60 °C našla o dvě alely méně.

Hardesty *et al.* (2013) otestováním 84 jedinců buňňáka světlonohého našli 11 mikrosatelitních lokusů. U mikrosatelitu Pc B109 detekovali při teplotě *annealingu* 57 °C 5 alel, já jsem u tohoto mikrosatelitu při  $T_A$  65 °C našla 3 alely.

Otestováním 68 jedinců buňňáka útlozobého charakterizovali Quillfeldt *et al.* (2012) sedm mikrosatelitů. *Cross-species* PCR amplifikací těchto mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého jsem našla 3 polymorfní lokusy – Patbel2, Patbel3, Patbel6 se čtyřmi, šesti a dvěma alelami s  $T_A$  65 °C, 62 °C a 53 °C. Autoři detekovali pro Patbel2 16 alel, Patbel3 vykazoval 10 alel a Patbel6 7 alel, teploty *annealingu* nebyly uvedeny.

Pro studium genetické variability v různých populacích buňňáka útlozobého izolovali Moodley *et al.* (2015) 25 polymorfních mikrosatelitů. PCR reakce byla provedena za použití dvou různých teplot *annealingu* – 30 cyklů proběhlo při  $T_A$  56 °C, dalších 8 cyklů při teplotě o 3 °C nižší. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého jsem detekovala 3 polymorfní lokusy s dvěma alelami. Dvě alely jsem zjistila při amplifikaci lokusů Pacbel\_08867 a Pacbel\_15327 s  $T_A$  55 °C, autoři u 74, respektive 75 jedinců detekovali shodně po 8 alelách. Pro lokus Pacbel\_10895 Moodley *et al.* (2015) popsali u 75 jedinců 19 alel, já jsem při  $T_A$  47 °C, stejně jako u dvou předchozích lokusů, detekovala alely pouze dvě.

Pro čeleď buňňákovití bylo doposud popsáno 54 mikrosatelitních lokusů, po jejichž otestování vykazovalo polymorfismus 11 z nich. Dva mikrosatelity pocházely od buňňáčka Monteirova (*Oceanodroma monteiroi*), tři od buňňáčka madeirského (*O. castro*) a šest polymorfních lokusů bylo odvozeno od buňňáčka dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*).

U buňňáčka dlouhokřídlého izolovali Bicknell *et al.* (2011) 26 mikrosatelitů, přičemž u pelikána bílého jsem našla u všech šesti polymorfních mikrosatelitů dvě alely s následujícími teplotami *annealingu*: 58 °C pro Ole01, 66 °C pro Ole09, 51 °C pro Ole13,

60 °C pro Ole19, 64 °C pro Ole25 a 53 °C pro Ole26. Autoři amplifikovali uvedené lokusy při  $T_A$  60 °C u 23–24 jedinců s výjimkou Ole26, kde s předpokladem vazby lokusu na pohlavní chromozom Z bylo testováno 25 samců a 22 samic. U lokusů Ole01 a Ole09 autoři detekovali 2 alely, u lokusu Ole13 zaznamenali 3 alely, u Ole19 8 alel, Ole25 vykazovalo 7 alel a u lokusu Ole26 popsali pro každé pohlaví 2 alely. U dvou jedinců pelikána bílého jsem PCR amplifikací lokusu Ole09 detekovala přítomnost nulových alel.

Sun *et al.* (2009) popsali 9 mikrosatelitních markerů u buňňáčka madeirského a 1 u buňňáčka dlouhokřídlého. Všechny lokusy amplifikovali při teplotě *annealingu* 50 °C. U lokusu Oc28B autoři našli 3 alely u 27 jedinců buňňáčka madeirského a 22 jedinců buňňáčka Monteirova, u 6 jedinců buňňáčka dlouhokřídlého byl tento lokus monomorfní. Stejně jako autoři jsem při  $T_A$  54 °C detekovala 3 alely. Amplifikací lokusu Oc79 jsem při  $T_A$  52 °C našla 2 alely, stejný počet alel byl zaznamenán i u buňňáčka madeirského a Monteirova. Amplifikací Oc84 jsem při  $T_A$  62 °C našla 2 alely, autoři u buňňáčka madeirského a dlouhokřídlého detekovali 3 alely a u buňňáčka Monteirova o jednu alelu navíc.

Osmnáct mikrosatelitů popsali Bried *et al.* (2012) a Andris *et al.* (2012) u buňňáčka Monteirova, který v důsledku lidské kolonizace obývá v současné době pouze dva neobydlené ostrůvky Azorských ostrovů. Autoři pro amplifikaci všech mikrosatelitů 125 jedinců použili jednotnou teplotu *annealingu* 58 °C. Amplifikací lokusu Omn3 při  $T_A$  64 °C jsem našla 2 alely, autoři alel šest. U lokusu Omn8 bylo autory nalezeno 10 alel, já jsem při  $T_A$  63 °C detekovala pouze 4 alely. Autoři rovněž provedli i *cross-species* PCR amplifikaci na 5 jedincích tří druhů – buňňáčka madeirského, buňňáka Bulwerova a buňňáka modravého. Nalezením 17 polymorfních lokusů u buňňáčka madeirského byla potvrzena jeho největší příbuznost s buňňáčkem Monteirovým. Po *cross-species* PCR amplifikaci 11 lokusů u jedinců buňňáka Bulwerova a 12 lokusů u jedinců buňňáka modravého autoři nezjistili žádný produkt.

Jediný polymorfní lokus z řádu dlouhokřídlí byl zjištěn po otestování 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Jednalo se o mikrosatelit Calex-01 pocházející od kulíka mořského z čeledi kulíkovití. U tohoto lokusu jsem při  $T_A$  69 °C určila 2 alely, Küpper *et al.* (2007) užitím teploty *annealingu* 62 °C detekovali u 42 jedinců deset alel. Tento lokus prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace testovali i Brown *et al.* (2009) u 340 jedinců buňňáka trinidadského, u kterých našli 4 alely s  $T_A$  55 °C.

V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci zaměřující se na klasifikaci druhů z kladu Aequorlitorornithes byly otestovány stejné *cross-species* páry primerů u potápky roháče (Janušová, 2015), nesyta indomalajského (Nedvěďová, 2015), plameňáka karibského (Strejčková, 2016), plameňáka růžového (Kůrová, 2017), pelikána kadeřavého (Verešová, 2018) a pelikána afrického (Kopečná, 2018).

Janušová (2015) *cross-species* PCR amplifikací s navrženými 213 páry primerů detekovala u potápky roháče (*Podiceps cristatus*) 20 polymorfních lokusů s dvěma až šesti alelami, zatímco u pelikána bílého bylo polymorfních pouze 6 z těchto lokusů.

U nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) provedla Nedvěďová (2015) *cross-species* PCR amplifikaci s 212 páry primerů, přičemž detekovala 46, respektive 45 polymorfních oblastí s dvěma až pěti alelami, jelikož dva páry primerů amplifikovaly stejný lokus. Já jsem při testování pelikána bílého našla čtrnáct polymorfních lokusů, které se s autorkou shodovaly.

Strejčková (2016) provedla *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), u 6 nepříbuzných jedinců tohoto druhu našla 50 polymorfních lokusů s dvěma až pěti alelami, u šestnácti z nich byl polymorfismus detekován i u testovaného pelikána bílého.

Kůrová (2017) testovala 213 párů primerů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) a našla celkem 48 polymorfních lokusů s dvěma až pěti alelami, z nichž šestnáct bylo shodně polymorfních s pelikánem bílým.

*Cross-species* PCR amplifikaci s 213 páry primerů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) provedla Verešová (2018), z nichž vyhodnotila 12 jako polymorfní s dvěma až třemi alelami, přičemž jeden pár primerů amplifikoval dvě polymorfní oblasti. V porovnání s pelikánem bílým vykazovalo shodu sedm polymorfních lokusů.

Kopečná (2018) u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace našla 24 polymorfních lokusů s dvěma až třemi alelami, dvanáct z nich jsem rovněž určila jako polymorfní u pelikána bílého.

Přehled 30 lokusů, které vykazovaly polymorfismus u pelikána bílého a některého z testovaných druhů z kladu Aequorlitorornithes, je uveden v Tabulce č. 6.

**Tabulka č. 6:** Přehled polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí, které byly pomocí *cross-species* PCR amplifikovány u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (tato práce) a současně byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (Kopečná, 2018), pelikána kadeřavého (Verešová, 2018), plameňáka karibského (Strejčková, 2016), plameňáka růžového (Kůrová, 2017), potápky roháče (Janušová, 2015) a nesyta indomalajského (Nedvědová, 2015). Číslem je vyjádřen počet nalezených alel, písmeno M označuje monomorfní lokus. Testovaný lokus Dc5 u pelikána bílého znázorňuje dvě polymorfní oblasti.

Mikrosatelitní lokus	Testovaný druh						
	Pelikán bílý	Pelikán africký	Pelikán kadeřavý	Plameňák karibský	Plameňák růžový	Potápka roháč	Nesyt indomalajský
Dc5	2 + 3	M	M	2	3	4	M
Dc31	2	M	2	3	2	M	M
BFAL4	2	2	2	2	M	M	2
LAAL19	3	M	M	3	M	M	M
Paequ2	2	3	2	M	M	M	M
Paequ3	3	3	M	2	4	M	2
Paequ8	2	2	M	2	M	M	4
Tch6	2	M	M	M	3	2	3
Cd1	4	M	2	M	M	M	4
Cd3	3	2	M	M	M	M	M
Cd5	2	2	M	2	2	M	M
Parm02	3	M	M	M	M	M	4
Bb20	2	M	M	M	2	M	M
Bb21	2	M	2	2	2	5	M
Bb25	3	2	M	3	3	M	M
Ptero09	5	M	M	M	M	M	2

Tabulka č. 6: Pokračování.

Mikrosatelitní lokus	Testovaný druh						
	Pelikán bílý	Pelikán africký	Pelikán kadeřavý	Plameňák karibský	Plameňák růžový	Potápka roháč	Nesyt indomalajský
Pc B109	3	2	M	3	2	5	M
Patbel2	4	2	M	M	M	5	5
Patbel3	6	3	M	M	2	M	M
Pacbel_08867	2	M	M	M	2	M	M
Pacbel_15327	2	M	M	M	2	M	2
Ole09	2	M	M	2	5	M	3
Ole13	2	M	M	3	M	M	M
Ole25	2	M	3	M	M	M	3
Ole26	2	2	M	M	M	M	3
Oc28B	3	M	M	2	3	M	M
Oc79	2	M	M	2	M	M	M
Omn3	2	M	M	2	M	M	M
Omn8	4	3	M	3	5	6	4
Calex-01	2	M	3	M	2	M	2

Doposud v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty v Olomouci bylo u nepříbuzných jedinců pelikána bílého otestováno v pěti pracích (včetně této) – Ranochová (2008), Mikulová (2010), Buržáková (2013) a Bartoňková (2013) – celkem 764 mikrosatelitů z řádu brodiví, veslonozí, plameňáci, vrubozobí a trubkonosí. Polymorfismus vykazovalo celkem 204 mikrosatelitních lokusů, což činí úspěšnost 26,7 %. U pelikána bílého se v současné době provádí testování 173 mikrosatelitů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů.

Pro získání více polymorfních mikrosatelitů navrhuji provést u pelikána bílého dotestování mikrosatelitů odvozených od řádu dlouhokřídli. Rovněž by bylo vhodné provést analýzu polymorfních mikrosatelitů zjištěných v této bakalářské práci na více jedincích pelikána bílého pro určení těch nejvhodnějších při studiu populačních a paternitních analýz.

## 7 Závěr

V této bakalářské práci jsem otestovala 213 párů primerů pomocí *cross-species* PCR amplifikace na 6 jedincích pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Tyto páry primerů byly původně navrženy pro amplifikaci mikrosatelitů u zástupců řádu trubkonosí, dlouhokřídlí a pěvci. Od druhů řádu trubkonosí bylo popsáno 207 mikrosatelitů, respektive 53 mikrosatelitů pocházelo z čeledi albatrosovití, 100 z čeledi buňňákovití a 54 z čeledi buňňáčkovití. Pět mikrosatelitů bylo izolováno z řádu dlouhokřídlí z čeledí alkovití, rackovití, kulíkovití a jeden z čeledi lesňáčkovití z řádu pěvci, které při *cross-species* testech u trubkonosých poskytovaly polymorfni produkty.

Po PCR amplifikaci těchto párů primerů na DNA pelikána bílého poskytlo produkt pouze 209 mikrosatelitů, u zbylých čtyř se i přes opakované snížení teploty *annealingu* až na 44 °C nepodařilo PCR produkt amplifikovat. Polymorfni produkt byl získán amplifikací 46 párů primerů, které poskytly celkem 47 polymorfni lokusů, protože mikrosatelit Dc5 měl dva polymorfni produkty. Pro každý z těchto lokusů byla určena teplota nasedání primerů ( $T_A$ ), délka elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu, počet alel a genotypy šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Největší počet alel jsem našla u lokusu Patbel3, u kterého jsem popsala celkem 6 alel. U ostatních lokusů bylo detekováno 2–5 alel. Nejvyšší úspěšnosti nalezení polymorfniho lokusu v rámci druhu dosáhla amplifikace lokusů s páry primerů navržených pro buňňáka šedého, pro který z 11 testovaných vykazovalo polymorfismus 6 lokusů, což činí 54,5 %. Celková úspěšnost nalezení polymorfniho lokusu činila 21,6 %. V závislosti na jednotlivých čeledích byla z 26 % nejúspěšnější čeleď buňňákovití. Z mikrosatelitů izolovaných od druhů z čeledi buňňáčkovití byl detekován polymorfismus ve 20,4 % případech, nejnižší úspěšnost amplifikace s detekcí polymorfniho lokusu vykazovala amplifikace s páry primerů navrženými pro čeleď albatrosovití, pouze 15,1 %.

Celkově jsem našla 8 polymorfni mikrosatelitů izolovaných od druhů z čeledi albatrosovití, 26 pocházelo od druhů z čeledi buňňákovití a 11 od druhů z čeledi buňňáčkovití. Posledním polymorfni mikrosatelitním lokusem byl Calex-01, popsáný u kulíka mořského z řádu dlouhokřídlí.



## 8 Použitá literatura

- Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuskript, dostupné online na <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>, navštíveno dne 24. 3. 2019.
- Andris, M., Arias, M. C., Barthel, B. L., Bluhm, B. H., Bried, J., Canal, D., Chen, X. M., Cheng, P., Chiappero, M. B., Coelho, M. M., Collins, A. B., Dash, M., Davis, M. C., Duarte, M., Dubois, M.-P., Françoso, E., Galmes, M. A., Gopal, K., Jarne, P., Kalbe, M., Karczmarski, L., Kim, H., Martella, M. B., McBride, R. S., Negri, V., Negro, J. J., Newell, A. D., Piedade, A. F., Puchulutegui, C., Raggi, L., Samonte, I. E., Sarasola, J. H., See, D. R., Seyoum, S., Silva, M. C., Solaro, C., Tolley, K. A., Tringali, M. D., Vasemägi, A., Xu, L. S., Zanón-Martínez, J. I. (2012): Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 February 2012 – 31 March 2012, Molecular Ecology Resources, 12, 779–781.
- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G. M., Bered, F., Fay, M. F., Lexer, C. (2007): Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Molecular Ecology, 16, 3759–3767.
- Bartoňková, I. (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Beckmann, J. S., Weber, J. L. (1992): Survey of human and rat microsatellites. Genomics, 12, 627–631.
- Bicknell, A. W. J., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Knight, M. E., Bilton, D. T., Votier, S. C. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's storm-petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). Conservation Genetics Resources, 3, 711–716.
- Bried, J., Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuskript, dostupné online na <https://www.yumpu.com/en/document/>

view/39976169/eighteen-polymorphic-microsatellite-markers-in-monteiros-storm, navštíveno dne 24. 3. 2019.

- Bried, J., Dubois, M.-P., Jouventin, P., Santos, R. S. (2008): Eleven polymorphic microsatellite markers in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*, and cross-species amplification on threatened Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 8, 602–604.
- Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009): Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology*, 150, 925–929.
- Burg, T. M. (1999): Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology*, 8, 338–341.
- Burg, T. M., Croxall, J. P. (2001): Global relationships amongst black-browed and grey-headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. *Molecular Ecology*, 10, 2647–2660.
- Burg, T. M., Croxall, J. P. (2004): Global population structure and taxonomy of the wandering albatross species complex. *Molecular Ecology*, 13, 2345–2355.
- Buržáková, K. (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Galvéz, D., Stewart, I. R. K., Horsburgh, G. J., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, A. W. J., Preston, S. A. J., Ekblom, R., Slate, J., Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*, 79, 506–514.
- Dawson, D. A., Horsburgh, G. Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., Hansson, B., Bacon, Il., Bird, S., Klein, Á., Krupa, A. P., Lee, J.-W., Martín-Galvéz, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L. G., Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.

- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.
- Dubois, M.-P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 905–907.
- Eisen, J. A. (1999): Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D. B., Schlötterer, C., *Microsatellites: Evolution and Application*. Oxford University Press, Oxford, 34–48.
- Ellegren, H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, 435–445.
- Friesen, V. L., González, J. A., Cruz-Delgado, F. (2006): Population genetic structure and conservation of the Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Conservation Genetics*, 7, 105–115.
- Gaisler, J., Zima, J. (2018): *Zoologie obratlovců*. Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Given, A. D., Mills, J. A., Baker, A. J. (2002): Isolation of polymorphic microsatellite loci from the red-billed gull (*Larus novaehollandiae scopulinus*) and amplification in related species. *Molecular Ecology Notes*, 2, 416–418.
- Glenn, T. C., Schable, N. A. (2005): Isolating microsatellite DNA loci. *Molecular evolution: producing the biochemical data*, Part B, volume 395, *Methods in enzymology*. Elsevier Academic Press, San Diego, 202–222.
- Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwaters, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1044–1046.
- Gosler, A. (1994): *Atlas ptáků světa*. Příroda, Bratislava.
- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, C. C., Yuri, T. (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science*, 320, 1763–1768.
- Hamilton, M. B., Pincus, E. L., Di Fiore, A., Fleischer R. C. (1999): Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, 27, 501–507.

- Hancock, J. M. (1996): Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays*, 18, 421–425.
- Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2013): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources*, 5, 27–29.
- Hedges, S. B., Sibley, C. G. (1994): Molecules vs. morphology in avian evolution: The case of the „pelecaniform“ birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9861–9865.
- Hernandez, L. D., Lounsbury, Z. T., Collins, P. W., Henry, R. W., Newsome, S. D., Sacks, B. N. (2014): Development and characterization of 15 polymorphic microsatellite markers for North Pacific albatrosses using paired-end Illumina shotgun sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 6, 491–493.
- Hudec, K., Hanzák, J. (1974): Světem zvířat. II. díl – Ptáci (1. část). Druhé přepracované a doplněné vydání. Albatros, Praha.
- Janušová, D. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y. W., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A., Weber, C. C., da Fonseca, R. R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W. C., Ray, D., Green, R. E., Bruford, M. W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y., Derryberry, E. P., Bertelsen, M. F., Sheldon, F. H., Brumfield, R. T., Mello, C. V., Lovell, P. V., Wirthlin, M., Schneider, M. P. C., Prosdocimi, F., Samaniego, J. A., Velazquez, A. M. V., Alfaro-Núñez, A., Campos, P. F., Petersen, B., Sicheritz-Ponten, T., Pas., A., Bailey, T., Scofield, P., Bunce, M., Lambert, D. M., Zhou, Q., Perelman, P., Driskell, A. C., Shapiro, B., Xiong, Z., Zeng, Y., Liu, S., Li, Z., Liu, B., Wu, K., Xiao, J., Yinqi, X., Zheng, Q., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Smeds, L., Rheindt, F. E., Braun, M., Fjeldsa, J., Orlando, L., Barker, F. K., Jønsson, K. A., Johnson, W., Koepfli, K.-P., O'Brien, S., Haussler, D., Ryder, O. A., Rahbek, C., Willerslev, E., Graves, G. R., Glenn, T. C., McCormack, J., Burt, D., Ellegren, H., Alström, P., Edwards, S. V., Stamatakis, A., Mindell, D. P., Cracraft, J., Braun, E.

- L., Warnow, T., Jun, W., Gilbert, M. T. P., Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.
- Kennedy, M., Taylor, S. A., Nádvorník, P., Spencer, H. G. (2013): The phylogenetic relationships of the extant pelicans inferred from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolutions*, 66, 215–222.
- Klauke, N., Masello, J. F., Quillfeldt, P., Segelbacher, G. (2009): Isolation of tetranucleotide microsatellite loci in the burrowing parrot (*Cyanoliseus patagonus*). *Journal of Ornithology*, 150, 921–924.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., Wilson, A. C. (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6196–6200.
- Kopečná, K. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Küpper, C., Horsburgh, G. J., Dawson, D. A., Ffrench-Constant, R., Székely, T., Burke, T. (2007): Characterization of 36 polymorphic microsatellite loci in the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) including two sex-linked loci and their amplification in four other *Charadrius* species. *Molecular Ecology Notes*, 7, 35–39.
- Kůrová, V. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Lawrence, H. A. (2008): Conservation genetics of the world's most endangered seabird, the Chatham Island tāiko (*Pterodroma magentae*). Dissertation. Auckland, New Zealand, dostupné online na <https://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>, navštíveno dne 24. 3. 2019.
- Lunt, D. H., Hutchinson, W. F., Carvalho, G. R. (1999): An efficient method for PCR based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular Ecology*, 8, 891–894.
- Mayr, G. (2003): The phylogenetic affinities of the Shoebill (*Balaeniceps rex*). *Journal of Ornithology*, 144, 157–175.

- Mayr, G. (2005): Tertiary plotopterids (Aves, Plotopteridae) and a novel hypothesis on the phylogenetic relationships of penguins (Spheniscidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43, 61–71.
- Mikulová, V. (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimanda, G. K., Thali, M. R., Alderman, R., Cuthbert, R. J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Phillips, R. A., Ryan, P. G., Suazo, C. G., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046–1058.
- Nedvědová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
- Primmer, C. R., Møller, A. P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365–378.
- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo, J. U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36, 348–360.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153, 367–373.
- Ranochová, A. (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener, S., Krawetz, S. A.: Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, 365–386.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schlötterer, C., Tautz, D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research, 20, 211–215.
- Sia, E. A., Kokoska, R. J., Dominska, M., Greenwell, P., Petes, T. D. (1997): Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. Molecular and Cellular Biology, 17, 2851–2858.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řád trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. Molecular Ecology Resources, 9, 913–915.
- Tang, J., Baldwin, S. J., Jacobs, J. M., Linden, C. G., Voorrips, R. E., Leunissen, J. A., van Eck, H., Vosman, B. (2008): Large-scale identification of polymorphic microsatellites using an in silico approach. BMC Bioinformatics, 9, 374.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004): Characterization of microsatellite loci in White-chinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. Molecular Ecology Notes, 4, 33–35.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. Genome Research, 10, 967–981.
- Verešová, D. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). Conservation Genetics Resources, 3, 581–584.
- Winkler, D. W., Billerman S. M., Lovette I. J. (2015): Bird families of the world. Lynx Editions, Barcelona.