

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Dominika Verešová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů
z řádu trubkonosí u pelikána kadeřavého
(*Pelecanus crispus*).**

Bakalářská práce

Dominika Verešová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

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

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa 11. 5. 2018

Súhrn

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo nájsť polymorfné mikrosatelity u pelikána kučeravého (*Pelecanus crispus*) pomocou *cross-species* PCR amplifikácie.

V rámci teoretickej časti bolo popísané zaradenie pelikána kučeravého do systému, bol popísaný rad veslonožče, čeľaď pelikánovité a nakoniec samotný pelikán kučeravý. Ďalšia časť bola zameraná na mikrosatelity, ich distribúciu v rôznych genómoch, mutácie a použitie najmä pri prevedení *cross-species* PCR amplifikácie. V poslednej časti boli opísané polymorfné mikrosatelity pre konkrétne druhy z radu rúrkonoce.

Praktická časť zahŕňala testovanie 213 mikrosatelitov na DNA 6 nepříbuzných jedincov pelikána kučeravého, pričom 207 bolo izolovaných *de novo* pre druhy patriace do radu rúrkonosce a zvyšných 6 mikrosatelitov, vykazovalo polymorfizmus pre tieto druhy, hoci boli izolované od zástupcov patriacich do radov bahniaky a spevavce.

Pomocou *cross-species* PCR amplifikácie bolo nájdených 12 polymorfných mikrosatelitov, pričom jeden z nich obsahoval dve miesta polymorfizmu. Jeden mikrosatelit neamplifikoval PCR produkt. Zvyšných 200 mikrosatelitov bolo monomorfných.

Summary

The aim of this bachelor thesis was finding polymorphic microsatellites in Dalmatian pelican (*Pelecanus crispus*) using cross-species PCR amplification.

Within the theoretical part, was described systematic classification of the Dalmatian pelican, the Pelecaniformes, the family Pelecanidae and finally the Dalmatian pelican. Next part was focused on microsatellites, their distribution in different genomes, mutations and application, especially, with using *cross-species* PCR amplification. In the last part, polymorphic microsatellites and their isolation for specific species from the order of Procellariiformes were described.

The practical part included testing of 213 microsatellites on DNA of 6 unrelated individuals of Dalmatian pelican, whereas 207 was isolated *de novo* for species belonging to the order Procellariiformes a remaining 6 microsatellites were showed to be polymorphic for these species, although, they were isolated from individuals from the orders Charadriiformes and Paseriiformes.

Using cross-species PCR amplification, 12 polymorphic microsatellites were found, while the one of them had two regions of polymorphism. One microsatellite did not amplified PCR product. Remaining 200 microsatellites were monomorphic.

Rada by som poďakovala svojmu školiteľovi RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph. D. za odborné vedenie, rady a pripomienky, ale aj za ochotu a trpezlivosť pri vypracovaní bakalárskej práce.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cieľ práce	2
3	Literárny prehľad	3
3.1	Zaradenie veslonožcov do systému.....	3
3.2	Rad veslonožce.....	5
3.2.2	Čeľaď pelikánovité	6
3.2.3	Pelikán kučeravý	7
3.3	Mikrosatelity	9
3.3.1	Rozdelenie a distribúcia mikrosatelitov	9
3.3.2	Mutácie mikrosatelitov	10
3.3.3	Použitie mikrosatelitov	11
3.3.4	Mikrosatelity popísané u druhov z radu rúrkonosce	12
4	Materiál a metódy	22
4.1	Biologický materiál	22
4.2	Chemikálie	22
4.3	Roztoky	23
4.4	Laboratórne prístroje	24
4.5	Mikrosatelity testované u pelikána kučeravého	25
4.6	PCR amplifikácia DNA.....	29
4.7	Spracovanie PCR produktov pomocou elektroforetickej separácie.....	29
5	Výsledky	33
6	Diskusia	39
7	Záver	44
8	Literatúra	45

Zoznam symbolov a skratiek

<i>Expressed Sequence Tag</i> (miesto s expresnou adresou)	EST
<i>Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR</i> (PCR amplifikácia s degenerovanými oligonukleotidovými primermi)	DOP-PCR PCR
<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i> (dlhé rozptýlené jadrové elementy)	LINEs
<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i> (náhodne amplifikovaná polymorfná DNA)	RAPD
<i>Short Interspersed Nuclear Elements</i> (krátke rozptýlené jadrové elementy)	SINEs
<i>Short Tandem Repeats</i> (krátke tandemové repetície)	STRs
<i>Simple Sequence Repeats</i> (jednoduché repetitívne sekvencie)	SSRs

Zoznam obrázkov

Obrázok č. 1: Skupina Aequorlitorlornithes podľa Prum <i>et al.</i> (2015).	5
Obrázok č. 2: Pelikán kučeravý (<i>Pelecanus crispus</i>).	8
Obrázok č. 3: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Cd1 amplifikovaného pri T_a 55 °C u 6 nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého, u ktorého boli detekované 2 alely.....	37
Obrázok č. 4: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu LAAL7 amplifikovaného pri T_a 66 °C u 6 nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého, u ktorého boli detekované 2 alely.	38
Schéma č. 1: Časové a teplotné podmienky PCR reakcie.	29
Graf č. 1: Prehľad 12 párov primerov, ktoré poskytli polymorfny produkt u pelikána kučeravého, farebne odlišených podľa druhu a jeho príslušnej čeľade, z ktorých boli izolované.	36

Zoznam tabuliek

Tabuľka č. 1: Zoznam mikrosatelitov izolovaných z čeľade albatrosovité testovaných na polymorfizmus u pelikána kučeravého.	26
Tabuľka č. 2: Zoznam mikrosatelitov izolovaných z čeľade víchrovníkovité testovaných na polymorfizmus u pelikána kučeravého.	26
Tabuľka č. 3: Zoznam mikrosatelitov izolovaných z čeľade víchrovníčkovité testovaných na polymorfizmus u pelikána kučeravého.	28
Tabuľka č. 4: Zoznam mikrosatelitov izolovaných z dvoch radov, a to bahniakov a spevavcov, testovaných na polymorfizmus u pelikána kučeravého.	28
Tabuľka č. 5: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre šesť vzoriek.	29
Tabuľka č. 6: Charakteristika 12 polymorfných mikrosatelitových lokusov testovaných na 6 nepříbuzných jedincov pelikána kučeravého.	34
Tabuľka č. 7: Prehľad 13 genotypov 6 nepříbuzných jedincov pelikána kučeravého amplifikovaných 11 párami primerov z radu rúrkonosce a jedným párom primerov od kulíka morského z radu bahniaky.	37
Tabuľka č. 8: Prehľad mikrosatelitových lokusov, izolovaných od druhov patriach do radov rúrkonosce a bahniaky, ktoré vykazovali polymorfizmus resp. monomorfizmus u jednotlivých testovaných druhoch.	42

1 Úvod

Mikrosatelity sú typom tandemových repetícií s dĺžkou repetitívnej jednotky 1–10 párov báz. Vysoký výskyt mutácií v mikrosatelitoch spôsobuje vysoký stupeň polymorfizmu, čím sa z nich stávajú najvhodnejšie a najčastejšie používané genetické markery. Využívajú sa v rôznych odvetviach genetiky a pri štúdiu evolučných a populačných vzťahov. Mikrosatelity sú pre konkrétne druhy izolované *de novo*. Avšak takýto druh izolácie je pomerne náročný, a preto sa využíva *cross-species* PCR amplifikácia, ktorá umožňuje amplifikovať už vopred izolované mikrosatelity u blízko príbuzných druhov.

V tejto bakalárskej práci sa budem venovať hľadaniu polymorfných mikrosatelitov u 6 jedincov pelikána kučeravého. Pomocou metódy *cross-species* PCR amplifikácie otestujem všetky mikrosatelity, ktoré som mala k dispozícii, charakterizované pre zástupcov z radu rúrkonosce a niekoľko mikrosatelitov, vykazujúc polymorfnosť u druhov z radu rúrkonosce, avšak izolovaných od druhov z ďalších dvoch radov a to bahniaky a spevace.

2 Ciele práce

1. Vypracovanie rešerše na tému bakalárskej práce.
2. Zhromaždenie dostupných literárnych zdrojov.
3. PCR amplifikácia pelikána kučeravého (*Pelecanus crispus*) s využitím *cross-species* primerov pre mikrosatelity, ktoré sú známe u vtákov z radu rúrkonosce (*Procellariiformes*, česky trubkonosí).

3 Literárny prehľad

3.1 Zaradenie veslonožcov do systému

Rad veslonožce (Pelecaniformes) je skupina veľkých morských vtákov, ktorú v zaužívanom systéme tvorí šesť nasledujúcich čeľadí a to, pelikánovité (Pelecanidae), kormoránovité (Phalacrocoracidae), anhingovité (Anhingidae), faetonovité (Phaetontidae), fregatkovité (Fregatidae) a sulovité (Sulidae, česky terejovité) (Hedges *et Sibley*, 1994).

Avšak až donedávna, bola morfológická charakteristika vodných vtákov jediným prostriedkom pre vytvorenie systematického zaradenia. Dnes už vieme, že klasifikácia na základe morfológie je nepresná a nedostačujúca. V súvislosti s vývojom pokročilejších technológií sa v posledných rokoch vykonávajú dômyselnejšie molekulárne analýzy, ktoré odhaľujú jednotlivé fylogenetické vzťahy medzi vodnými vtákmi. Aj v rámci toho sa využíva fosilný materiál, ktorý u veslonožcov patrí medzi najstaršie a najspoľahlivejšie záznamy, pochádzajúce už z ranného eocénu z obdobia paleogénu (Warheit, 2001).

Hedges *et Sibley* (1994) vo svojich štúdiách spochybňujú tradičný monofyletický pohľad na pôvod radu veslonožce a poukazujú na príbuzenské vzťahy medzi čeľadami fregatkovité a Procellariidae. DNA-DNA hybridizáciou prezentujú, že pelikány sú najpríbuznejšie s člnozobcom z čeľade člnozobcovité (Balaenicipitidae). Suly, kormorány a anhingy tvoria klad, ktorého druhy sú si navzájom veľmi príbuzné, pričom faetony nie sú blízko príbuzné k týmto taxónom. Tieto výsledky, ukazujúce na jasné rozdiely medzi morfológickou a molekulárnou charakteristikou organizmov, boli potvrdené na základe analýzy mitochondriálnej DNA.

Mayr (2003) tvrdí, že podobnosti medzi čeľadami z radu veslonožce sú výsledkom konvergentnej evolúcie, a nie na základe spoločného pôvodu a teda, že rad veslonožce je parafyletický. Podľa neho, suly sú príbuznejšie s fregatkami ako s pelikánmi a na základe analýzy jadrových génov, anhingy a kormorány tvoria spoločnú taxonomickú jednotku (Mayr, 2005).

Podľa Hacketta *et al.* (2008) je člnozobec príbuzný s takatrou z čeľade takatrovité (Scopidae, česky kladivoušovité) a pelikány tvoria sesterský taxón k tomuto kladu. Livezey *et Zusi* (2007) potvrdili jednoznačný monofyletický pôvod nadradu Suloidea (suly, anhingy a kormorány). Z hľadiska morfológického, najbližší sesterský

taxón k Suloidea sú fregatky, naopak, z molekulárneho hľadiska pelikány. Faetony sú k týmto vodným vtákom vzdialene príbuzná skupina a priradzujú sa k rúrkonoscom (Procellariiformes, česky trubkonosí) (Bourdon, 2005) či tučniakom (Brown, 2008).

Neskôr, Smith (2010) vo svojich štúdiách polemizoval o monofýlii radu a porovnával ho opäť na základe morfológických a molekulárnych analýz. Zistil, že tieto vtáky majú podobnú životnú históriu a v ekológii sa veľmi nelíšia, no napriek tomu vykazujú veľkú odlišnosť v diverzite a extrémne rozdiely medzi jednotlivými kladmi navzájom.

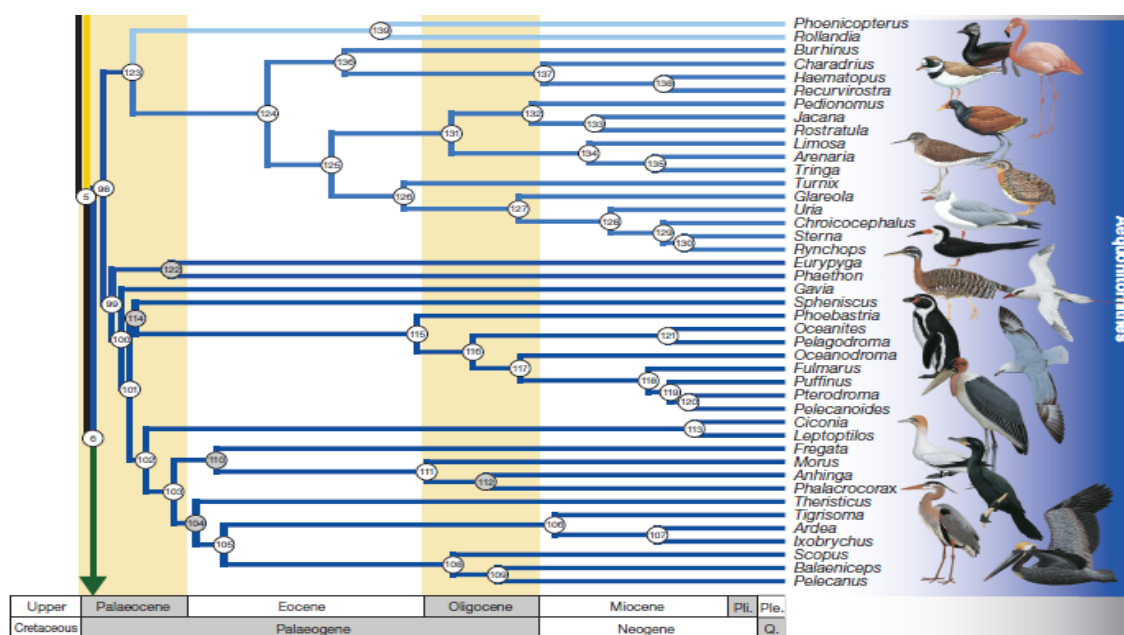
Analýzou celých genómov sa zaoberali Jarvis *et al.* (2014), pričom skúmali 48 rôznych druhov zo všetkých radov skupiny Neoaves. Vyčlenili dve veľke podskupiny nazývané Columbea a Passera. V rámci Passera sa nachádza klad Aequornithia, kam patria vodné a potápajúce sa vtáky, pričom faetony tvoria sesterský klad k tejto skupine.

Prum *et al.* (2015) naopak rozdelili vtáky Neoaves do 5 skupín a to: Strisores, Columbaves, Gruiformes, Inopinaves a Aequorlitorornithes. V skupine Aequorlitorornithes (viď obrázok č.1) sú zahrnuté všetky vodné vtáky, výnimku tvoria zúbkozobce (Anseriformes, česky vrubozobí). Z tohto kladogramu vyplýva, že rod pelikán a rod člnozobec tvoria sesterský taxón. K tomuto kladu je potom najpríbuznejší rod takatra. K týmto trom rodom sú najpríbuznejšie vtáky patriace do rodu volavka a k nim je najpríbuznejší rod ibis. K všetkým doteraz zmieneným rodom je príbuzná skupina rodov, ktorej jadro tvoria sesterský taxón kormorány a anhingy, k nim príbuzné suly a nakoniec fregatky.

Systematické zaradenie pelikána kučeravého podľa Gaisler *et Zima* (2007) je nasledujúce:

Ríša:	živočíchy (Animalia)
Kmeň:	strunovce (Chordata)
Podkmeň:	stavovce (Vertebrata)
Trieda:	vtáci (Aves)
Rad:	veslonožce (Pelecaniformes)
Čeľaď:	pelikánovité (Pelecanidae)
Rod:	pelikán (<i>Pelecanus</i>)
Druh:	pelikán kučeravý (<i>Pelecanus crispus</i>)

Obrázok č. 1: Skupina Aequorlitorornithes podľa Prum *et al.* (2015).



3.2 Rad veslonožce

Príslušníci radu veslonožce podľa systému Hedges *et* Sibley (1994) sú výborní plavci a jediní vtáci s veslovacou nohou, ktorá má plávaciú blanu medzi všetkými štyrmi prstami. Táto úprava nôh im umožňuje účelné plávanie, kormidlovanie, ale aj potápanie. Mnohí majú široké krídla a sú veľmi dobrými letcami. Fregatky a faetony strávia väčšinu času svojho života v lete, ďalší členovia radu sú schopní dlhého vytrvalostného letu. Majú mohutný zobák a rôzne veľký hrdelný vak, ktorý je holý a neoperený (Gaisler *et* Zima, 2007).

Živia sa predovšetkým rybami a obojživelníkmi, popr. hmyzom a červami. K lovu rýb používajú niekoľko metód. Kormorány a anhiny prenasledujú svoju korisť pod vodu. Ich povrchové operenie ľahko nasiakne vodu, zníži vznášanie tela a uľahčuje potápanie, pričom vnútorné perie naďalej poskytuje tepelnú izoláciu. Naopak, ostatní členovia tohto radu majú operenie nezmáčavé a ich kosti obsahujú veľký objem vzduchových priestorov, takže ľahko plávajú a lietajú. Suly a faetony sa vrhajú strmhlav na korisť. Ich výhodou je to, že majú navyše vzdušné vaky pod kožou ako tlmiče nárazu pri dopadnutí na vodu. Fregatky väčšinou kradnú ryby iným vtákom. Pelikány využívajú k lovu rýb vak uložený na spodnej čeľusti. Tento vak im slúži aj na pitie dažďovej vody a má funkciu termoregulácie. Vďaka malým nozdrám sa potápajú pod

hladinu bez toho, aby vdýchli vodu. Formujú sa do radov a vháňajú ryby do plytčín. Často lovia spoločne (Burnie, 2002).

Hniezdia väčšinou v kolóniách na zemi v rôznych skaliskách alebo na stromoch. Samci majú pri toku pozoruhodné prejavy, napr. suly vztyčujú hlavu aj chvost a zdvíhajú krídla. Hniezda budujú obaja partneri spoločne. Mláďatá sú nidikolné, rodičia ich kŕmia vyvrhovanou potravou (Gaisler *et* Zima, 2007).

Veslonožce sa vyskytujú v trópoch, subtrópoch až miernom pásme celého sveta (Hanzák, 1974). Aj keď sú to primárne morské vtáky, anhingy, kormorány a pelikány žijú aj v sladkovodných oblastiach vo vnútrozemí.

3.2.2 Čelad' pelikánovité

Do čelade pelikánovité zaraďujú Kennedy *et al.* (2013) jeden rod pelikán s ôsmimi recentnými druhmi. Patria k nim pelikán severoamerický (*Pelecanus erythrorhynchos*) žijúci v severnej Amerike a pelikán hnedý (*P. occidentalis*), ktorý sa pohybuje od pobrežia severnej Ameriky, Karibik až po sever južnej Ameriky. Ďalej, pelikán hnedý je najpočetnejší druh v rámci všetkých pelikánov a delí sa na päť poddruhov: *P. o. occidentalis*, *P. o. californicus*, *P. o. carolinensis*, *P. o. murphyi* a *P. o. urinator*. Spolu s pelikánom bledohlavým (*P. thagus*) alebo inak prezývaným pelikánom peruánskym, vyskytujúcim sa na pobrežiach južnej Ameriky v okolí Chile a Peru, sú výhradne morskými vtákmi. Najväčším druhom z rodu pelikán je pelikán kučeravý (*P. crispus*), ktorý obýva juhovýchod Európy a migruje až do Indie či Číny. Subtropickú a tropickú Afriku obýva pelikán africký (*P. rufescens*). Pelikán biely (*P. onocrotalus*) sa vyskytuje najmä vo východnom Stredomorí, Indočíne a Malajskom poloostrove. Na juhu Ázie, Pakistanu až na východe Indonézie je možné nájsť pelikána škvrnozobého (*P. philippensis*). V Austrálii a Novej Guinei sa nachádza len jediný pelikán a to pelikán austrálsky (*P. conspicillatus*).

Pelikány sú ťažké a mohutné lietajúce vtáky. Vyzerajú neohrabane, ale pri love sú veľmi obratní. Ich zobák je dlhý a na konci mierne zahnutý. Dolnú čeľusť tvoria dve tenké a ohybné, na špičke spojené vetvy, medzi ktorými sa nachádza rozťahnutelný vak (Hanzák, 1974). K veľkému pomeru tela majú veľmi krátke nohy. Krídla sú dlhé a široké, vďaka čomu dokážu letieť bez prestávky až 24 hodín a za tento čas prekonať až 500 km. Lietajú v dlhých radoch a v rýchlosti plachtenia sa riadia vedúcim vtákom. Pri lete majú obyčajne zobák priložený na krku (Hudec *et al.*, 2016).

Hniezdia v krovinách aj na voľnom priestranstve. Tvoria obrovskú kolóniu s tisícami monogamných párov. Samec je obvykle väčší ako samica a má dlhší zobák (Marchant *et* Higgins, 1990). Kladú dve až štyri modrobiely vajíčka. Obaja rodičia sa podieľajú na stavbe hniezda a sedení na vajíčkách (Winkler *et al.*, 2015). K zahrievaniu vajec im napomáhajú široké plávacie blany na nohách. Mláďatá sa liahnu postupne, čo je výhodou, pokiaľ je nedostatok potravy. Mláďatá si berú natrávenú potravu z hrdelného vaku rodičov (Hanzák, 1974)

V prvých rokoch svojho života dosahujú najväčšiu hmotnosť, až 14 kg, vďaka veľkým zásobám tuku (Alderton, 1995). Pohlavnú dospelosť dosahujú v troch až piatich rokoch. V prírode sa dožívajú 15–25 rokov, v zajatí sa jeden z pelikánov dožil až 54 rokov (Hudec *et al.*, 2016).

Morské pelikány, sfarbené do hneda, žijú na morských pobrežiach. Nevyskytujú sa len na východe južnej Ameriky, v Oceánii a na Novom Zélande. Naopak, sladkovodné druhy, šedé alebo biele, sa vyskytujú na ústiach veľkých riek či vnútrozemských jazier (Hanzák, 1974).

Ľudia často narušajú kolónie pelikánov zbieraním vajec či zabíjaním mláďat. Tak isto sú ohrozené zmenami a ničením ich životného prostredia. Tri druhy pelikánov, pelikán bledohlavý, kučeravý a škvrnozobý, sú dnes považované za ohrozené v dôsledku ľudskej činnosti (Winkler *et al.*, 2015).

3.2.3 Pelikán kučeravý

Pelikán kučeravý je najväčší európsky pelikán (Burnie, 2002). Môže vážiť okolo 10–13 kg. Je vysoký asi 140–160 cm s rozpätím krídel až 250–300 cm (Brown *et al.*, 1982).

Má robustné telo a napriek svojej veľkosti a hmotnosti sa v dobe ťahu vznáša veľmi vysoko na svojich širokých krídlach. Je striebrobiele sfarbený, zospodu je šedobiely. Čierne má len konce krídel. Pod mohutným svetložltým zobákom s oranžovou špičkou má oranžovo červený vak. Má malú lysinu okolo oka a svetlú dúhovku. Nohy sú tmavošedé. Na zadnej strane hlavy má kučeravé pierka, vďaka čomu získal svoj druhový názov. Na rozdiel, pelikán biely, s ktorým býva často zamenený, má ružový nádych peria a čiernobiely krídla zospodu (Burnie, 2002). Dospelý jedinec pelikána kučeravého je na obrázku č. 2.

Obrázok č. 2: Pelikán kučeravý (*Pelecanus crispus*).

(Autorom je Khaled Al Nasrallah a tento obrázok je zdieľaný na základe povolenia Licence Creative Commons z internetového zdroja <http://www.kuwaitbirds.org/birds/dalmatian-pelican>)



Samica a samec pelikána kučeravého sa sfarbením nelíšia. V období rozmnožovania sa zhlukujú do početných skupín. Obvykle majú tri mláďatá, rodičia im nosia potravu a asi po šiestich týždňoch začínajú mladé pelikány loviť ryby. O mesiac neskôr vykonávajú svoj prvý let (Burnie, 2002). Pohlavnú dospelosť pelikány dosahujú v treťom roku života.

Pelikán kučeravý spolu s ostatnými druhmi pelikánov sa živia rybami, ktoré chytajú priamo na vodnej hladine, na rozdiel od pelikánov hnedých, ktorí sa za nimi potápajú. Denne spotrebujú až 1 kg rýb, konzumujú najmä úhory a parmice. Lovia samy alebo v malej skupine. Napriek tomu, bola v Grécku zaznamenaná podivuhodná kooperatíva medzi pelikánom kučeravým a kormoránom veľkým (*Phalacrocorax carbo*). Kormorány vyhľadávajú pelikány kvôli tieňom, ktoré vytvárajú na hladine vody, vďaka ktorým vidia lepšie korisť. Pelikány naopak využívajú splašenosť pri love kormoránov a to im uľahčuje lovenie rýb (Hudec *et al.*, 2016).

Často hniezdia vo veľkých kolóniách, na niekoľkých miestach juhovýchodnej Európy ako je Rumunsko či Bulharsko. Okrem Európy sa tiež vyskytujú v oblasti Malej Ázie, Kazachstane, v severovýchodnej Číne a v Mongolsku (Hanzák, 1974).

Pelikán kučeravý patrí medzi globálne ohrozené druhy. Podľa Červeného zoznamu ohrozených druhov (IUCN) bol v roku 1994 zaradený medzi zraniteľné druhy a to najmä vďaka veľkému úbytku prirodzeného prostredia a ilegálnym odstreľom (Anonymus, 2016). Momentálne najrozsiahlejšie kolónie sa nachádzajú pri jazere Mikri Prespa v Grécku s celkovým množstvom až tisíc párov. V súčasnosti sa počet voľne žijúcich jedincov odhaduje na 10–20 tisíc vtákov (Anonymus, 2016).

3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity sú typom tandemových repetícií, označovaných aj ako STRs (Short Tandem Repeats) alebo SSRs (Simple Sequence Repeats). Dĺžka ich repetitívnej jednotky je 1–6 párov báz (Primmer *et al.*, 1997), zatiaľ čo iní autori uvádzajú až 1–10 párov báz (Tóth *et al.*, 2000). Nachádzajú sa v prokaryotických aj eukaryotických genómoch, v kódujúcich aj nekódujúcich DNA sekvenciách organizmov (Field *et Wills*, 1998; Tóth *et al.*, 2000). Molekulárna genetika využíva mikrosatelity ako genetické markery pri štúdiu evolučných a populačných vzťahov využívajúc ich vlastnosť vysokého stupňa polymorfizmu (Zane *et al.*, 2002).

3.3.1 Rozdelenie a distribúcia mikrosatelitov

Oliveira *et al.* (2006) klasifikujú mikrosatelity na základe opakujúcej sa sekvencie na dokonalé, nedokonalé, prerušované a zložené. Sekvencie dokonalých mikrosatelitov nie sú rušené žiadnou inou bázou, naopak, v nedokonalých mikrosatelitoch sa nachádza báza, ktorá sa nevyskytuje v základnom motíve sekvencie. Krátka sekvencia, ktorá neodpovedá sekvencii základného motívu, vložená medzi jednotky repetície mikrosatelitu odpovedá prerušovanému mikrosatelitu. Zložený mikrosatelit je tvorený dvoma odlišnými motívmi repetície, ktoré na seba nadväzujú.

Podľa dĺžky opakujúceho sa motívu sa mikrosatelity tiež delia na mono-, di-, tri- až dekanukleotidové (Tóth *et al.*, 2000). Bolo preukázané, že v nekódujúcich oblastiach sa mikrosatelity nachádzajú vo väčšom množstve ako v exónoch (Hancock, 1995), a tiež, že frekvencia jednotlivých mikrosatelitov je u každého taxónu iná (Beckmann *et Weber*, 1992).

Najčastejším typom mikrosatelitov nachádzajúcich sa v proteín-kódujúcich oblastiach sú trinukleotidové a hexanukleotidové mikrosatelity (Oliveira *et al.*, 2006). Aj napriek tomu, že frekvencia trojnukleotidových mikrosatelitov sa každou triedou v podkmeni stavovcov pomerne líši, množstvo ich repetícií napríklad u človeka hrá veľkú rolu v rôznych neurodegeneratívnych poruchách ako je napríklad syndróm fragilného X chromozómu či Huntingtonova choroba.

Naopak, v intrónoch a intergénových regiónoch je počet jednotlivých mikrosatelitov špecifický takmer pre každý taxón. Dominujú najmä tetranukleotidové u stavovcov a pentanukleotidové mikrosatelity u cicavcov. Dinukleotidové mikrosatelity sa takmer vôbec nenachádzajú v exónoch, v intrónoch sa nachádzajú najmä u hlodavcov a najmenej v hubách (Oliveira *et al.*, 2006).

Rozdiely v obsahu a type mikrosatelitov u organizmov súvisia s veľkosťou genómu, ale aj s rôznymi enzýmami a proteínmi, ktoré sa zapájajú do množstva procesov DNA a remodelácie chromatinu (Hancock, 1996).

U vtákov je frekvencia mikrosatelitov výrazne nižšia ako u iných stavovcov. Jedným z vysvetlení je fakt, že vtáky majú najmenšiu veľkosť spomedzi stavovcov, s čím súvisí ich nízky obsah nekódujúcej DNA, v ktorej sa mikrosatelity nachádzajú (Primmer *et al.* 1997). Ďalej, elementy známe ako SINEs a LINEs sú u ostatných stavovcov asociované s výskytom mikrosatelitov (Beckmann *et* Weber, 1992) a pravidelne majú poly(A) zakončenia. Tieto zakončenia poskytujú základ pre vývoj rôznych typov repetícií. Podľa Primmera *et al.* (1997) neexistuje žiadna asociácia medzi mikrosatelitmi a elementmi SINEs u vtákov a navyše vtáčie LINEs i SINEs nemajú poly(A) zakončenia ako iné skupiny stavovcov (Chen *et al.* 1991).

3.3.2 Mutácie mikrosatelitov

Rozšírenie mutácií v mikrosatelitoch je omnoho vyššie ako v iných častiach genómu a vyskytuje sa v rozmedzí 10^{-2} až 10^{-6} na lokus a generáciu (Sia *et al.*, 2000). Sia *et al.* (1997) na výskumoch *in vivo* potvrdili, že rýchlosť mutácií mikrosatelitov súvisí s dĺžkou repetitívnej jednotky. Ďalšími možnými faktormi ovplyvňujúcimi vyšší výskyt mutácií v mikrosatelitoch sú hraničné sekvencie, typy sekvencií opakujúceho sa motívu či rýchlosť rekombinácie alebo transkripcie (Schlötterer, 2000).

Jedným z hlavných mutačných mechanizmov je DNA *slippage* (Tachida *et* Iizuka, 1992). Tento proces môže nastať počas DNA replikácie alebo opravy DNA,

kedy jednotlivé „chyby“ v DNA reťazci uniknú opravnému mechanizmu a exonukleázovej aktivite polymerázy (Eisen, 1999). Vznikajúci DNA reťazec sa potom dočasne disociuje z templátového reťazca počas replikácie DNA (Levinson *et* Gutman, 1987) a spätne reasociuje, ale v inej pozícii. To vedie k chybnému párovaniu báz a k inzercii či delícii určitých nukleotidov na jednotlivých reťazcoch. Nové vzniknuté vlákno je teda dlhšie alebo kratšie ako templátové vlákno.

Ďalším procesom ovplyvňujúcich výskyt mutácií je rekombinácia, a to cestou nerovnomerného crossing-overu alebo génovou konverziou (Goldstein *et* Schlotterer, 1999). K nerovnomernému crossing-overu môže dôjsť medzi sesterskými chromatidami jedného chromozómu alebo medzi dvoma chromozómami navzájom. Jeho výsledkom sú dve nerovnomerné časti DNA vlákien, pričom na jednom z nich došlo k inzercii a na druhom k delícii určitého fragmentu DNA (Smith, 1976; Dover, 1982). K takémuto crossing-overu dochádza najmä vtedy, kedy správna schopnosť rekombinačného mechanizmu je znížená vďaka veľkému množstvu opakujúcich sa sekvencií na jednotlivých vláknach DNA (Smith, 1973). Pri génovej konverzii sa vďaka rekombinácii odohrávajú zmeny len na jednom reťazci DNA.

3.3.3 Použitie mikrosatelitov

Použitie mikrosatelitov sa v dnešnej dobe neustále zvyšuje (Ellegren *et al.*, 1995). Doteraz patria medzi najpoužívanejšie genetické markery a to najmä vďaka ich kodominantnej a vysoko polymorfnej povahe, využívajúca sa v experimentoch spojenými s PCR reakciami (Gupta *et al.*, 1999).

Primery použité v PCR reakcii vyžadujú vysoký stupeň homológie s cieľovou sekvenciou, aby prebehla PCR amplifikácia. Mikrosatelity sa nachádzajú v nekódujúcich sekvenciách, v ktorých je prirodzene vyšší výskyt mutácií. Tento vyšší nahromadený počet mutácií inhibuje amplifikáciu mikrosatelitových lokusov v zdrojovom druhu s primermi aplikovanými na cieľové druhy, a preto nemôžu byť jednotlivé primery použité univerzálne. U druhov, ktoré sa skúmajú prvýkrát, sú jednotlivé mikrosatelity izolované *de novo* (Primmer *et al.*, 1996).

Keďže hľadanie mikrosatelitových markerov *de novo* je časovo aj finančne náročné, *in silico* metódy sa stali vhodnejšou alternatívou pre ich vývoj. ESTs sú krátke sekvencie DNA, ktoré charakterizujú exprimované gény odvodené od cyklickej DNA tvoriac genomickú knižnicu. Dáta v takejto knižnici umožňujú hodnotenie génovej

expresie, poskytujú informácie o génoch a ich potencionálnych variáciách, determinujú rôzne sekvencie a pod. Mikrosatelity je potom vďaka tomu možné odvodiť z týchto databáz pomocou rôznych počítačových softvérov a simulácii.

Hoci jednotlivé mikrosatelitné primery nemôžu byť všeobecne používané univerzálne, určitá úroveň mikrosatelitnej amplifikácie je možná medzi blízko príbuznými druhmi v tzv. *cross-species* PCR amplifikácií (Moore *et al.*, 1991). Stupeň úspešnosti takejto amplifikácie je spojený s fylogenetickou vzdialenosťou medzi dvoma druhmi, pôvodným, z ktorého boli mikrosatelity izolované a testovaným, na ktorom boli mikrosatelity aplikované (Primmer *et al.*, 1996).

Faktorom, ktorý tiež dokáže zvýšiť šancu na úspešnú *cross-species* PCR amplifikáciu, je zníženie annealingovej teploty PCR a to nezávislé na fylogenetickej príbuznosti medzi zdrojovým a testovaným druhom (Primmer *et al.*, 2005).

Mikrosatelity ako genetické markery sa využívajú najmä v populačnej genetike, pri štúdiu evolučných vzťahov alebo mapovaní génov. Napriek tomu, že mikrosatelity sú variabilné v svojej dĺžke, dedia sa podľa Mendelovskej dedičnosti, čo je výhodné pri analýze paternity a príbuzenských vzťahov živočíchov.

3.3.4 Mikrosatelity popísané u druhov z radu rúrkonosce

Rad rúrkonosce je skupina morských vtákov, ktorá sa delí do štyroch čeľadí a od ktorých bolo doteraz izolovaných 207 polymorfných mikrosatelitov. Z čeľade víchrovníkovité (Procellariidae, česky buňňákovití), s najvyšším počtom druhov, bolo popísaných 100 mikrosatelitov. U zástupcov z čeľade víchrovníčkovité (Hydrobatidae, česky buňňáčkovití) 54 mikrosatelitov a z čeľade albatrosovitých (Diomedidae) zasa 53 mikrosatelitov. U druhov z čeľade pelikánovcovité (Pelecanoididae, česky buňňíkovití) nebol popísaný zatiaľ žiadny polymorfný mikrosatelit. Ďalej bolo použitých 6 mikrosatelitov, ktoré boli polymorfné u zástupcov z radu rúrkonosce, preto boli tiež zaradené do testovania. Tieto mikrosatelity boli odvodené od 5 druhov patriacich do radu bahniaky a jeden mikrosatelit od horárika zlatého patriaceho do radu spevace.

3.3.4.1 Mikrosatelity popísané u druhov z čeľade albatrosovité

Burg (1999) izolovala a charakterizovala 26 mikrosatelitových lokusov od dvoch druhov: albatros sťahovavý (*Diomedea exulans*) a albatros sivohlavý (*Thalassarche chrysostoma*). Genómová DNA od oboch druhov bola štiepená restriktívnou

endonukleázou *AluI*. Fragmenty veľké 300–800 bp boli ligované do plazmidu pUC19 a transformované do DH5 α *E. coli*. Bakteriálne kolónie boli preverené za použitia (AC)₁₅ syntetických sond. Druhá knižnica bola obohatená o AC a CTTT repetície. Z kolónií obsahujúcich mikrosatelitové sekvencie, bolo navrhnutých 31 párov primerov, avšak iba 26 z nich úspešne amplifikovalo PCR produkt. *Cross-species* amplifikácia sa uskutočnila s použitím genomickej DNA od 50 jedincov albatrosa sivohlavého, 90 jedincov albatrosa sťahovavého a 50 jedincov albatrosa čiernobrvého (*Thalassarche melanophris*). Úroveň polymorfizmu sa pohybovala od 2 do 11 alel. U albatrosa sťahovavého neprebehla amplifikácia dvoch lokusov, konkrétne Dc10 a Dc19, u zvyšných dvoch druhov amplifikácia prebehla úspešne.

Vzťahy v štruktúre populácie medzi albatrosom čiernobrvým a albatrosom sivohlavým s použitím mitochondriálnej DNA a mikrosatelitov analyzovali Burg *et* Croxall (2001). Mitochondriálna DNA bola izolovaná od 123 jedincov žijúcich na piatich ostrovoch Atlantického oceánu a extrahovaná za použitia Chelexu. V experimente boli použité polymorfne lokusy (Burg, 1999), ku ktorým bol pridaný jeden novo nájdený lokus De35. Na populačnú analýzu pre oba druhy, bolo vybraných sedem najvariabilnejších lokusov z celkových počtu 37 izolovaných lokusov. Mikrosatelitové lokusy u albatrosa čiernobrvého obsahovali 4–13 alel na lokus a u albatrosa sivohlavého zasa 5–22 alel na lokus.

Burg *et* Croxall (2004) vo svojich štúdiách riešili štruktúru a taxonómiu populácie medzi albatrosom sťahovavým a ďalšími dvoma druhmi albatrosa (*Diomedea antipodensis* a *D. gibsoni*). Jednotlivé krvné vzorky boli odobrané dospelým jedincom žijúcim na siedmych rôznych ostrovoch Atlantického oceánu. Genomická DNA, z odobraných 772 krvných vzoriek, bola extrahovaná pomocou Chelexu. Bolo využitých osem, skôr izolovaných mikrosatelitových lokusov (Burg, 1999) a jeden lokus De37, ktorý pred tým ešte nebol popísaný. Ten vykazoval polymorfizmus so šiestimi, resp. siedmimi alelami. Lokus De33 sa ukázal ako viazaný na pohlavie, preto bol z testov vylúčený. Celkový polymorfizmus všetkých druhov sa pohyboval v rozmedzí 2–21 alel na lokus.

Desať nových dinukleotidových mikrosatelitov pre albatrosa sťahovavého popísali Dubois *et al.* (2005). Vzorky DNA boli extrahované z krvi pomocou QIAmp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitné lokusy boli izolované z genomickej knižnice obohatenej o (TC)₁₀ a (TG)₁₀ repetície, za použitia biotínom značených mikrosatelitových sond, magnetických guľôčok potiahnutých streptavidínom a XL10

Gold ultrakompetentných bakérií *E. coli* (Stratagene). Z 1248 screenovaných klonov, 254 obsahovalo mikrosatelity a 132 z nich bolo sekvenovaných. PCR primery boli navrhnuté pre 94 klonov a pre ďalšiu analýzu bolo nakoniec vybraných 15 lokusov, ktoré obsahovali najmenej prerušovaných sekvencií. Variabilita mikrosatelitov bola testovaná v troch populáciách albatrosa, pričom každá obsahovala 20 jedincov. Desať z 15 lokusov vykazovalo polymorfizmus s 2–13 alelami.

Hernandez *et al.* (2014) charakterizovali 15 polymorfných mikrosatelitových lokusov od albatrosa čiernonohého (*Phoebastria nigripes*), nemenlivého (*P. immutabilis*, česky albatros laysanský) a bielochrbtého (*P. albatrus*). Genomická DNA bola izolovaná zo svalového tkaniva 51 jedincov daných druhov pomocou DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN). Vďaka NEB Next® Ultra™ DNA 19 Library prep Kit for Illumina® a NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina zostavili génomovú knižnicu. Vybrali 44 amplifikujúcich sa lokusov, ktoré obsahovali di-, tri- a tetranukleotidové repetície, pre ktoré boli navrhnuté primery podľa programu Primer 3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Z týchto lokusov bolo pomocou Multiplex Manager vybraných 16 lokusov, na ktorých sa testoval polymorfizmus u 36 jedincov albatrosa čiernonohého, 12 jedincov albatrosa nemenlivého a 3 jedincov albatrosa bielochrbtého. U albatrosa čiernonohého a nemenlivého bolo 13 polymorfných lokusov s 2–18 alelami a u albatrosa bielochrbtého vykazovalo polymorfizmus 14 lokusov s 2–7 alelami.

3.3.4.2 Mikrosatelity popísané u druhov z čeľade víchrovníkovité

Techow *et O’Ryan* (2004) izolovali a charakterizovali šesť dinukleotidových mikrosatelitových lokusov pre víchrovníka bielobradého (*Procellaria aequinoctialis*). Vzorka odobraná z tkaniva víchrovníka bola štiepená proteínázou K a získaná DNA bola ďalej podrobená fenol-chloroformovej extrakcii a následne zrazená etanolom. Genómová knižnica, obohatená o CA repetície, bola vytvorená z DNA piatich jedincov s použitím PCR amplifikácie s degenerovanými oligonukleotidovými primermi (DOP-PCR). Vzniknuté fragmenty boli klonované pomocou pGEM-T-Easy Vector System (Promega). Po selekcii na médiu s obsahom ampicilínu a X-gal, boli klony preverené na prítomnosť inzertov. Nasledovala amplifikácia pozitívnych klonov. Z 21 sekvenovaných rekombinantných plazmidov 17 obsahovalo mikrosatelity, pričom dva lokusy boli sekvenované dvakrát. Pomocou programu DNAMAN verzia 4.13 (Lynnon BioSoft) boli navrhnuté primery pre 10 mikrosatelitov obsahujúcich vhodné hraničné

sekvencie. Každý mikrosatelitový lokus bol testovaný na variabilitu minimálne u 68 jedincov víchrovníka, pričom u šiestich z desiatich mikrosatelitov sa prejavil polymorfizmus s 3–9 alelami. Dané mikrosatelity boli pomocou *cross-species* PCR amplifikácie tiež testované u ďalších šiestich druhov: albatrosa sťahovavého, albatrosa čiernobrvého, albatrosa sivohlavého, víchrovníka okuliarnatého (*Procellaria conspicillata*, česky buňák tristsanský), plavca veľkého (*Macronectes giganteus*, česky buňák obrovský) a plavca tmavého (*M. hallis*, česky buňák Hallův). Celková variabilita v rámci testovaných druhov bola v rozmedzí 1–6 lokusov. Najvyšší počet polymorfných mikrosatelitov, konkrétne šesť, sa vyskytoval u víchrovníka okuliarnatého. Najmenší počet, jeden polymorfný lokus Paequ2, sa prejavil u albatrosa sťahovavého. Ostatné druhy vykazovali 3–5 polymorfných mikrosatelitov. Počet alel v tomto testovaní neboli uvedené.

Bried *et al.* (2008) objavili jedenásť polymorfných dinukleotidových mikrosatelitov pre víchrovníka plavého (*Calonectris diomedea*, česky buňák šedý). Z krvných vzoriek bola extrahovaná DNA pomocou QIAmp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitové lokusy boli izolované z genómickej knižnice, ktorá bola obohatená o repetície (GCC)₆, (TA)₁₀, (CG)₁₀ a (TG)₁₀ za použitia biotínom značených mikrosatelitových sond, magnetických guľôčok potiahnutými streptavidínom a XL10 Gold ultrakompetentných bakérií *E. coli* (Stratagene) (Dubois *et al.*, 2005). Z celkového počtu 3036 klonov bolo 262 klonov osekvenovaných a pre 15 klonov, ktoré vykazovali najmenšie množstvo prerušovaných sekvencií, boli navrhnuté PCR primery. Následne prebehla PCR amplifikácia. Mikrosatelitová variabilita bola testovaná u 43 jedincov víchrovníka plavého, pričom 11 z 15 mikrosatelitov vykazovalo polymorfizmus s 2–8 alelami na lokus. Mikrosatelit Cd4 ani v jednom prípade u samičieho pohlavie nebol heterozygotný, pravdepodobne preto, že lokus bol viazaný na pohlavie. Polymorfné mikrosatelity u víchrovníka plavého boli pomocou *cross-species* PCR amplifikácie testované u ďalších troch druhov: albatrosa sťahovavého, víchrovníka bielobradého a víchrovníka holubieho (*Bulweria bulwerii*, česky buňák Bulwerův). Najvyšší počet polymorfných lokusov, konkrétne 10, bol zistený u víchrovníka holubieho, u ktorého sa amplifikovalo celkovo 11 lokusov. U víchrovníka bielobradého boli zo siedmich amplifikovaných lokusov polymorfné dva lokusy. Cd1 bol jediný polymorfný lokus z piatich amplifikovaných lokusov u albatrosa sťahovavého.

Dva polymorfné mikrosatelitové lokusy od tajfúnnika taiko (*Pterodroma magentae*, česky buňák taiko) charakterizovala Lawrence (2008). Z krvi odobranej 145

jedincom bola extrahovaná DNA fenol-chloroformovou metódou. Bola zostavená genómicná knižnica obohatená o GT, GA, AAT, AAAG a GATA repetície. Z 2016 testovaných klonov bolo 178 sekvenovaných a 99 z nich obsahovalo mikrosatelity. Pre deväť mikrosatelitových sekvencií boli navrhnuté primery podľa programu Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Po PCR amplifikácii sa vyhodnotila variabilita a ako polymorfne mikrosatelity sa ukázali lokusy Tch6 s dvoma alelami a Tch25 so štyrmi alelami. U tajfúnnika taiko bolo ďalej prostredníctvom *cross-species* PCR amplifikácie testovaných 22 mikrosatelitov navrhnutých pre iné druhy vtákov. Šesť z nich bolo polymorfnych s 2–9 alelami: Paequ3, Paequ8 a Paequ13 (Techow *et* O’Ryan, 2004), De33 (Burg, 1999) a RBG18, RBG29 izolovaných od vtákov z radu bahniaky (*Charadriiformes*, česky dlouhokřídlí) (Given *et al.*, 2002).

Desať polymorfnych mikrosatelitov pre víchrovníka baleárskeho (*Puffinus mauretanicus*, česky buňňák balearský) bolo izolovaných a charakterizovaných Gonzalesom *et al.* (2009). Vzorky boli odobraté zo svalového tkaniva, štiepené proteinázou K a podrobené fenol-chloroformovej extrakcii. Následne boli štiepené restriktčnými enzýmami *RsaI* a *XmnI* a ligované do univerzálnych SNX adaptérov. Boli zostavené genómicke knižnice obohatené o CA a AAAG repetície. Biotinylovaná DNA bola ligovaná do pGEM-T-Easy vektoru (Promega) a transformovaná do baktérie *E. coli*. Pozitívne kolónie boli detekované chemiluminiscenciou (CSP-Star detection kit, Sigma). Pomocou M13 primerov bolo 162 klonov sekvenovaných, 108 z nich obsahovalo mikrosatelity a nakoniec bolo vybratých 23 klonov, pre ktoré boli navrhnuté primery pomocou programu Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 1998). Deväť sekvencií bolo úspešne amplifikovaných. Celková variabilita bola sledovaná u 55 jedincov. U desiatich lokusov bol zistený polymorfizmus s 2–10 alelami. Lokus Puff Sma6 bol viazaný na pohlavie, konkrétne na W chromozóm, preto jeho amplifikácia prebehla len u samíc. Daných desať polymorfnych lokusov bolo testovaných opäť pomocou *cross-species* PCR amplifikácie na 23 jedincoch víchrovníka hnedastého (*P. yelkouan*, česky buňňák středomořský). U tohto druhu prebehla amplifikácia všetkých lokusov, jeden z nich bol monomorfný, u ostatných lokusov sa počet alel pohyboval v rozmedzí 2–9.

Brown *et* Jordan (2009) izolovali šesť mikrosatelitných lokusov pre tajfúnnika admirálskeho (*Pterodroma arminjoniana*, česky buňňák trinidadský). Vzorky boli odobrané z tkaniva troch uhynulých mláďat a následne extrahované fenol-chloroformovou metódou. Z genómicných knižníc, obohatených o CA a CAGA repetície, boli izolované mikrosatelitové lokusy. Obohatené fragmenty boli klonované pomocou Original TA

Cloning Kit (Invitrogen) a pozitívne klony testované na prítomnosť inzerťov. Plazmidy, ktoré obsahovali inzerty boli sekvenované za použitia M13 primerov a BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Pomocou softwaru Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000) boli pre mikrosatelitové lokusy navrhnuté vhodné primery. Zo 43 testovaných párov primerov šesť z nich amplifikovalo produkt. Tri z nich, konkrétne Parm01, Parm02, Parm03, boli polymorfne s 4–10 alelami. Zvyšné tri páry, Parm04, Parm05 a Parm06 poskytli monomorfný produkt.

Všetkých šesť mikrosatelitov bolo znova testovaných u ďalších 17 druhov z radu rúrkonosce a jedného druhu tučniaka, tučniaka žltohlavého (*Eudyptes chrysolophus*, česky tučňák žltorohý). Mikrosatelity Parm01 a Parm02 sa amplifikovali u všetkých 17 druhov, pričom Parm01 bol polymorfný u dvanástich druhov a Parm02 vykazoval polymorfizmus u piatich druhov. Lokusy Parm03, Parm04 boli polymorfne u piatich druhov s 2–6 alelami, respektíve 4 druhov s 2–4 alelami. Parm05 sa u 13 druhov neamplifikoval vôbec a len u troch druhov bol zistený polymorfizmus s 2–3 alelami. Lokus Parm06 bol u 16 druhov amplifikovaný a u šiestich druhov polymorfný vždy s dvoma alelami. U tučniaka žltohlavého sa lokusy Parm04, Parm05 neamplifikovali vôbec, Parm06 sa prejavil ako monomorfný a zvyšné tri lokusy vykazovali polymorfizmus s 2–7 alelami. Pomocou *cross-species* PCR amplifikácie bolo u tajfúnnika admirálskeho testovaných ďalších 53 mikrosatelitov izolovaných od iných druhov vtákov z čeľadí albatrosovité (Burg, 1999, Dubois *et al.* 2005), víchrovníkovicité (Techow *et* O’Ryan, 2004) a z čeľade kulíkovité (Küpper *et al.*, 2007) z radu bahniaky. Polymorfných bolo šesť mikrosatelitov a to Paequ3, Paequ13,10C5, 12H8, De11 a Calex01.

Andris *et al.* (2010) izolovali jedenásť dinukleotidových mikrosatelitov od víchrovníka holubieho. Vtáčia DNA bola z krvi extrahovaná za použitia QIAmp Tissue Kit (QIAGEN). Za použitia biotínom značených oligonukleotidových mikrosatelitových sond, streptavidínom potiahnutými magnetickými guľičkami a JM 09 vysokoúčinných kompetentných buniek *E. coli* (Promega) boli mikrosatelitové lokusy izolované z genómickej knižnice obohatenej o (TG)₁₀ a (TC)₁₀ repetície. Podľa modifikovanej PCR (Dubois *et al.*, 2005) boli rekombinantné klony testované na (TG)₁₀, (TC)₁₀ a AGE1 alebo AGE2 oligonukleotidy. Pomocou genetického analyzáru ABI 3130 (Applied Biosystems) bolo celkovo 352 pozitívnych klonov sekvenovaných a z 282 vhodných sekvencií bolo vybraných 25 lokusov s najnižším množstvom prerušovaných repetíc na ďalšiu analýzu. Variabilita bola testovaná na 91 dospelých jedincov.

Dvadsaťštyri lokusov vykazovalo polymorfizmus, avšak kvôli amplifikačným problémom a zníženej heterozygotnosti bolo vybratých len jedenásť mikrosatelitov, u ktorých bolo detekovaných dve až osem alel. Keďže žiadna zo 44 samíc nevykazovala heterozygotnosť v lokuse Bb11, bol určený ako viazaný na pohlavie. *Cross-species* amplifikácia daných jedenástich mikrosatelitov bola vykonaná u troch ďalších druhov: víchrovníka bielobradého so 6 polymorfnými lokusmi, hladinára modrého (*Halobaena caerulea*, česky buňňák modravý), u ktorého bolo polymorfných 10 lokusov a víchrovníčka azorského (*Oceanodroma monteiroi*, česky buňňáček Monteirův) z čeľade víchrovníčkovité, ktorý vykazoval len 5 polymorfných lokusov.

Desať nových polymorfných mikrosatelitových lokusov izolovali Welch *et* Fleischer (2011) pre tajfúnnika havajského (*Pterodroma sandwichensis*, česky buňňák havajský). Genomická DNA bola extrahovaná z krvi jedného samca a jednej samice tajfúnnika. Následne bola DNA štiepená na fragmenty o veľkosti 200–1000 bp. Fragmenty boli ligované do SNX linkerov, amplifikované a vykonala sa hybridizácia s oligonukleotidovými sondami, čím boli jednotlivé fragmenty obohatené o mikrosatelitové repetície. Po amplifikácii fragmentov prebehla ligácia do pBluescript II SK + plazmidov a nakoniec transformácia do ultrakompetentných buniek *E. coli*. Ďalšími analýzami bolo nakoniec vybratých 54 klonov, pre ktoré boli navrhnuté vhodné primery za použitia programu Primer 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Navyše, pomocou *cross-species* PCR amplifikácie, bolo u tajfúnnika havajského testovaných 37 už publikovaných párov primerov od druhov z radu rúrkonosce (Techow *et* O’Ryan, 2004, Bried *et al.*, 2008, Brown *et* Jordan, 2009, Gonzalez *et al.*, 2009), spevavce (Dawson *et al.*, 1997) a z radu bahniaky (Given *et al.*, 2002). Z 37 známych mikrosatelitov a 54 novo izolovaných mikrosatelitov bolo polymorfných po desať lokusov s 3–14 alelami, resp. 3–10 na lokus. Variabilita bola testovaná u pätnástich jedincov tajfúnnika havajského.

Quillfeldt *et al.* (2012) pri štúdiu mimopárovej paternity u hladinára tenkozobého (*Pachyptila belcheri*, česky buňňák útlozobý) navrhli sedem mikrosatelitných lokusov. Z peria a krvi 102 jedincov bola za použitia DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) extrahovaná DNA. Podľa Klauke *et al.* (2009) bola prevedená PCR amplifikácia, izolácia mikrosatelitov a klonovanie. Sedem testovaných párov primerov zároveň vykazovalo polymorfizmus s detekovaným množstvom alel v rozsahu 5 až 16. Zo siedmych markerov však boli dva z nich vylúčené z analýzy a to Patbel2, u ktorého sa prejavila

veľká podobnosť alel s ostatnými markermi a Patbel5, ktorý sa prejavil ako viazaný na pohlavie.

Jedenásť polymorfných mikrosatelitov izolovali Hardesty *et al.* (2013) od víchrovníka bledonohého (*Puffinus carneipes*, česky buňňák svetlonohý). Z krvi a peria extrahovaná DNA bola štiepená siedmymi restriktčnými enzýmami na fragmenty o veľkosti 300–750 bp. Tieto fragmenty sa naviazali na adaptory, ktoré boli zachytené pomocou biotinylovaných magnetických guľičiek. Z naamplifikovanej DNA boli pomocou restriktčného enzýmu *HindIII* odstránené adaptory a výsledné fragmenty boli ligované do *HindIII* miesta pUC19. Klony, ktoré obsahovali mikrosatelity boli sekvenované a amplifikované. Variabilita mikrosatelitových lokusov bola testovaná na 90 jedincoch víchrovníka bledonohého, kde 11 lokusov bolo polymorfných s 3–11 alelami.

Moodley *et al.* (2015) izolovali 25 nových polymorfných mikrosatelitových lokusov pre hladinára tenkozobého. Vzorky z krvi, peria a svalového tkaniva boli odobrané dospelým jedincom z čeľade víchrovníkotvaré: hladinárovi tenkozobému, hladinárovi širokozobému (*Pachyptila vittata*, česky buňňák širokozobý), hladinárovi popolavému (*P. salvini*, česky buňňák Salvinův), hladinárovi čarovnému (*P. turtur*, česky buňňák hrdliččí), hladinárovi holubiemu (*P. desolata*, česky buňňák holubí), hladinárovi modrému a búrkozvestovi pestronohému (*Oceanites oceanicus*, česky buňňáček Wilsonův) z čeľade víchrovníčkovité, žijúcich na antarktických ostrovoch. Z DNA dvoch jedincov hladinára tenkozobého, extrahovanej za použitia DNeasy Tissue Kit (QIAGEN), boli izolované mikrosatelitové sekvencie. Fragmenty o veľkosti 300–800 bp, štiepené z genómickej DNA, boli ligované do ssDNA knižnice, z ktorej boli izolované mikrosatelitové sekvencie. Pre tieto sekvencie boli navrhnuté vhodné primery. Z celkových 517 sekvencií bolo 36 párov primerov testovaných na polymorfizmus a *cross-species* PCR amplifikáciu u štyroch jedincov hladinára tenkozobého a troch jedincov hladinára holubieho. U hladinára tenkozobého vykazovalo 25 lokusov polymorfizmus. Pre dôkladnejšiu analýzu, boli tieto lokusy znova testované u 77 jedincov hladinára tenkozobého. Počet alel jednotlivých lokusov sa pohyboval od 5 do 48 na lokus. Všetkých 25 lokusov bolo tiež použitých pre *cross-species* PCR amplifikáciu u zvyšných piatich, pred tým zmienených, druhov. U všetkých druhov sa prejavila variabilita, s 2–51 alelami na lokus. Najmenšiu variabilitu vykazoval búrkozvest pestronohý s pätnástimi polymorfnými lokusmi, ktorý patrí do inej čeľade ako zvyšné testované druhy.

3.3.4.3 Mikrosatelity popísané u druhov z čeľade víchrovníčkovité

Sun *et al.* (2009) navrhli primery pre desať mikrosatelitových lokusov u troch druhov: víchrovníčka černastého (*Oceanodroma castro*, česky buňňáček madeirský), víchrovníčka azorského (*O. monteiroi*, česky buňňáček Monteirův) a víchrovníčka severského (*O. leucorhoa*, česky buňňáček dlouhokřídly). Zo siedmych zamrznutých krvných vzoriek víchrovníčka černastého (Friesen *et al.*, 2007) za použitia klonovania (Glenn *et Schable*, 2005) bola skonštruovaná genómickej knižnica. DNA bola štiepená enzýmom *AluI* na fragmenty veľkosti 200–1200 bp, ktoré boli následne ligované do SNX linkerov. Ligovaný produkt bol hybridizáciou obohatený o biotinylované oligonukleotidové sondy. Izolovaná DNA bola ligovaná do PCR 2.1-TOPO vektoru (Invitrogen) a transformovaná do TOP 10 One Shot *E. coli* kompetentných buniek (Invitrogen). Z knižnice obsahujúcej 96 klonov bolo 53 sekvenovaných. Zo 46 sekvencií obsahujúcich mikrosatelity bolo vybratých deväť, u ktorých sa vyskytovalo deväť a viac repetícií, a pre ktoré boli navrhnuté primery (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Do genómickej knižnice prispeli aj zmrazené vzorky dvoch jedincov víchrovníčka severského. Z týchto vzoriek bolo sekvenovaných 21 klonov a pre dva z nich boli navrhnuté páry primerov, avšak len jeden pár primerov amplifikoval produkt. U každého, víchrovníčka černastého aj azorského, bolo polymorfných 9 lokusov. U víchrovníčka severského vykazovalo polymorfizmus 6 lokusov. Rozsah alel u všetkých druhov sa pohyboval v rozmedzí 2 až 11 na lokus. Daných desať navrhnutých mikrosatelitov bolo testovaných vďaka *cross-species* PCR amplifikácii u víchrovníčka tichomorského (*O. tethys*, česky buňňáček galapážsky), víchrovníčka obojkového (*O. hornbyi*, česky buňňáček límcový) a tajfúnnika tmavochrbtého (*Pterodroma phaeopygia*, česky buňňák tmavohřbetý) z čeľade víchrovníčkovité. U týchto druhov boli takmer všetky produkty PCR amplifikované, výnimkou boli lokusy Oc64B a Oc79-2. Údaje o polymorfizme, resp. monomorfizme autori neuviedli.

Dvadsaťšesť polymorfných mikrosatelitov od víchrovníčka severského charakterizovali Bicknell *et al.* (2011). Genómickej DNA bola extrahovaná z krvi pomocou zrážania octanom amónnym. Zostavená genómickej knižnica bola obohatená o repetície, s naviazanými magnetickými guľčkami (Glenn *et Schable*, 2005). Zo sekvenovaných transformovaných kolónií bolo izolovaných 211 mikrosatelitových sekvencií a pre 50 z nich boli navrhnuté primery pomocou programu Primer 3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000), ktoré následne testovali na polymorfizmus. Variabilita bola

testovaná na 4–6 jedincov víchrovníčka severského, pričom šesť lokusov neamplifikovalo produkt a zo zvyšných 44 lokusov bolo 26 polymorfných. Na polymorfizmus boli tiež testované už existujúce mikrosatelity, konkrétne 7 mikrosatelitov izolovaných od iných rôznych druhov patriacich do čeľade víchrovníčkovité a 47 ďalších mikrosatelitov vykazujúcich veľkú prenosnosť medzi druhmi (Dawson *et al.*, 2010). Z týchto 47 lokusov bolo polymorfných 15, 30 z nich bolo monomorfných a 2 z nich neamplifikovali produkt. Dokopy 41 polymorfných lokusov bolo ďalej testovaných na 24 jedincoch, pričom bolo detekovaných 2 až 22 alel na lokus.

Bried *et al.* (2012) popísali 18 nových polymorfných mikrosatelitových markerov pre vzácny druh, víchrovníčka azorského. Vtáčia DNA bola extrahovaná z krvných vzoriek pomocou QIAmp Tissue Kit (QIAGEN). Z obohatenej genómickej knižnice boli izolované mikrosatelitové lokusy a následne pyrosekvenované podľa Meglécz *et al.* (2010) a Malausa *et al.* (2011). Zo sekvencií, obsahujúcich motív mikrosatelitov dlhší ako päť repetícií a súčasne ktorých veľkosť sa pohybovala 80–469 bp, bolo vybraných 27 lokusov s najvyšším množstvom neprerušovaných repetícií. K analýze variability bolo využitých 18 lokusov, ktoré boli testované u 125 jedincov. Rozsah alel sa pohyboval v rozmedzí 4 až 17 alel na lokus. Žiadna zo 65 samíc nevykazovala heterozygotnosť v lokuse Omn23, pravdepodobne pre väzbu na pohlavie. Ďalej, autori uskutočnili *cross-species* PCR amplifikáciu 18 lokusov u víchrovníčka čiernastého, víchrovníka holubieho a hladinára modrého. Najúspešnejšia amplifikácia prebehla u víchrovníčka čiernastého, so 17 polymorfnými lokusmi s detekovanými 2–6 alelami na lokus. U víchrovníka holubieho sa amplifikovalo 7 lokusov, pričom tri z nich boli polymorfné, každý s dvoma alelami. Hladinár modrý vykazoval dva polymorfné lokusy s 3 až 6 alelami.

4 Materiál a metódy

4.1 Biologický materiál

Na analýzu bola použitá krv, odobraná šiestim nepríbuzným jedincom pelikána kučeravého (*Pelecanus crispus*) chovaným v ZOO Dvůr Králove. Genomická DNA bola izolovaná za použitia fenol-chloroformovej metódy vedúcim bakalárskej práce. Koncentrácia nariadenej DNA bola 10–50 µg/ml.

4.2 Chemikálie

- akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/µl), M1241 (Promega)
- bromfenolová modrá (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l, 400 µl každého), U1240 (Promega)
- deionizovaná voda
- dusičnan strieborný (Sigma)
- etanol – 96% roztok (Lieho var Vrbátky)
- etyléndiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachner)
- formaldehyd (AppliChem)
- formamid (Lachema)
- hydroxid sodný (Lachner)
- chlorid sodný (Lachema)
- kyselina boritá (Lachner)
- kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- kyselina octová (Lachner)
- 3-metakryloxypropyltrimetoxysilan (Serva)
- močovina (Lachner)
- N, N'-metylénbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N'-tetrametyletyléndiamín (TEMED) (AppliChem)
- peroxidisíran amonný (Lachner)
- Rain off – tekuté stierače (Sheran)
- thosíran sodný (Lachema)
- trishydroxymetylaminometán (Tris) (AppliChem)
- uhličitan sodný (Lachner)

- xylenová modrá (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.3 Roztoky

- dusičnan strieborný, 0,1% roztok

- 0,8 g dusičnanu strieborného
- 800 ml deionizovanej vody
- pred použitím pridať 1,2 ml formaldehydu

- fix/stop roztok

- 800 ml deionizovanej vody
- 88 ml ľadovej kyseliny octovej

- hydroxid sodný, 1 mol/l roztok

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

- kyselina dusičná, 1% roztok

- 12 ml 65% kyseliny dusičnej
- 800 ml deionizovanej vody

- nanášací roztok pre elektrofortickú separáciu

- 0,125 g xylénovej modrej
- 0,125 g bromfenolovej modrej
- 25 ml deionizovanej vody
- 100 ml formamidu

- peroxodisíran amonný, 10% roztok

- 1 g peroxodisírane amonného
- rozpustiť v 10 ml deionizovanej vody
- uchovávať v chladničke

- polyakrylamidový 6% gél

- 60 ml 6% zásobného roztoku akrylamidu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisírane amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- 40 µl N, N, N', N' - tetrametyletyléndiamínu

- reakčný pufr 10x pre aTaq DNA polymerázu:

- 80 ml deionizovanej vody
- 1,211 g Tris (alebo 6,7 ml Tris 1 mol/l)
- pH upraviť pomocou HCl na hodnotu 9
- 3,73 g KCl
- 1 ml Triton X-100
- po rozpustení doplniť na 100 ml

- roztok 3-metakryloxypropyltrimetoxysilanu

- 1 ml 0,5% kyseliny octovej v 96% etanole
- 3 µl 3-metakryloxypropyltrimetoxysilanu

- vývojka

- 24 g uhličitanu sodného
- 800 ml deionizovanej vody
- vychladiť na teplotu nižšiu ako 10 °C
- pred použitím pridať 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku tiosíranu sodného

- zásobný roztok akrylamidu, 6%

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizovanej vody
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml 40% zásobného roztoku akrylamid : N, N'- metylénbisakrylamid 19:1
- po rozpustení všetkých zložiek sfiltrovať a uložiť v tmavej fľaši v 4 °C

- zásobný roztok 10x TBE pufr

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

4.4 Laboratórne prístroje

- elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- hybridizačná pec HB-2D (Techne)

- chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- laboratórne váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- magnetická miešačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- mikropipety Finnpiquette – 0,5 až 10 µl (osemkanálová) a 0,3 µl až 1 ml (Thermo Lab Systems)
- mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- spektrofotometer ND-1000 (Thermo Scientific)
- negatoskop NEGA1 (Maneko)
- sekvenačná elektroforetická komôrka S2 (Whatman Biometra)
- sušiareň CAT 8050 (Contherm)
- termocykler GenePro (BIOER)
- termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- termocykler TC XP (BIOER)
- trepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- vortex mixér (Labnet International)
- vortex MS2 (Ika)
- výrobnik deionizovanej a ultračistej vody typ 02 (AquaOsmotic)
- výrobnik ľadu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

4.5 Mikrosatelity testované u pelikána kučeravého

Dvestotrinásť párov primerov bolo využitých ku *cross-species* PCR amplifikácií mikrosatelitových lokusov u 6 nepříbuzných jedincov pelikána kučeravého, pričom 207 z nich bolo izolovaných *de novo* od druhov z radu rúrkonosce a zvyšných 6 párov bolo pôvodne navrhnutých pre PCR amplifikáciu u iných druhov z radov bahniaky a spevavce.

Z čeľade albatrosovité bolo od 8 druhov izolovaných 53 polymorfných mikrosatelitov (viď tabuľka č. 1).

Tabuľka č. 1: Zoznam mikrosatelitov izolovaných z čeľade albatrosovitých testovaných na polymorfizmus u pelikána kučeravého.

Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literárny zdroj
albatros sťahovavý (albatros sťahovavý, <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 sivohlavý (albatros šedohlavý, <i>D. chrysostoma</i>)	Dc5, Dc9, Dc10, Dc16, Dc19, Dc20, Dc21, Dc22, Dc26, Dc27, Dc31	
albatros sivohlavý	D6, D24, D29, D32	
albatros sťahovavý		
albatros Gibsonov (albatros Gibsonův, <i>D. gibsoni</i>)	De37	Burg <i>et</i> Croxall, 2004
albatros hnedo-biely (albatros jižní, <i>D. antipodensis</i>)	De37	Burg <i>et</i> Croxall, 2004
albatros sťahovavý		
albatrosa čiernobrvý (albatros čiernobrvý, <i>T. melanophris</i>)	De35	Burg <i>et</i> Croxall, 2001
albatros sivohlavý		
albatros bieločrbtý (albatros bělohřbetý, <i>Phoebastria albatrus</i>)	STAL4, STAL8, STAL12, STAL18, STAL20, STAL 24	Hernandez <i>et</i> <i>al.</i> , 2014
albatros čiernonohý (albatros čiernonohý, <i>P. nigripes</i>)	BFAL4, BFAL11, BFAL14, BFAL19, BFAL20	
albatros nemenlivý (albatros laysanský, <i>P. immutabilis</i>)	LAAL1, LAAL7, LAAL10, LAAL19	

Z čeľade víchrovníkovitých bolo od 9 druhov izolovaných 100 polymorfných mikrosatelitov (viď tabuľka č. 2).

Tabuľka č. 2: Zoznam mikrosatelitov izolovaných z čeľade víchrovníkovitých testovaných na polymorfizmus u pelikána kučeravého.

Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literárny zdroj
víchrovník bielohradý (buňňák bělohradý, <i>Procellaria aequinoctialis</i>)	Paequ2, Paequ3, Paequ4, Paequ7, Paequ8, Paequ10, Paequ13	Techow <i>et</i> O'Ryan, 2004

Tabuľka č. 2: Pokračovanie.

Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literárny zdroj
víchrovník plavý (buňňák šedý, (<i>Calonectris diomedea</i>)	Cd1, Cd2, Cd3, Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd10, Cd11	Bried <i>et al.</i> , 2008
tajfúnnik taiko (buňňák taiko, (<i>Pterodroma magentae</i>)	Tch6, Tch25	Lawrence, 2008
tajfúnnik admirálsky (buňňák trinidaský, <i>P. arminjoniana</i>)	Parm01, Parm02, Parm03, Parm04, Parm05, Parm06	Brown <i>et</i> Jordan, 2009
tajfúnnik havajský (buňňák havajský, (<i>P. sandwichensis</i>)	Ptero01, Ptero02, Ptero03, Ptero04, Ptero05, Ptero06, Ptero07, Ptero08, Ptero09, Ptero10	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011
víchrovník holubí (buňňák Bulwerův, <i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb2, Bb3, Bb7, Bb10, Bb11, Bb12, Bb20, Bb21, Bb22, Bb23, Bb25	Andris <i>et al.</i> , 2010
víchrovník baleársky (buňňák baleársky, <i>Puffinus mauretanicus</i>)	Puff 1.5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2C, PuffG2F, Puff G11F, Puff PM2, Puff Sma6	Gonzales <i>et al.</i> , 2009
víchrovník bledonohý (buňňák svetlonohý, <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
hladinár tenkozobý (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

Z čeľade víchrovníčkovité bolo od 3 druhov izolovaných 54 polymorfných mikrosatelitov (viď tabuľka č.3).

Tabuľka č. 3: Zoznam mikrosatelitov izolovaných z čeľade víchrovníčkovité testovaných na polymorfizmus u pelikána kučeravého.

Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literárny zdroj
víchrovníček černastý (buňňáček madeirský, <i>Oceanodroma castro</i>)	Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B	Sun <i>et al.</i> , 2009
víchrovníček severský (buňňáček dlouhokřídly, <i>O. leucorhoa</i>)	O110-39 Ole01, Ole02, Ole03, Ole04, Ole05, Ole06, Ole07, Ole08, Ole09, Ole10, Ole11, Ole12, Ole13, Ole14, Ole15, Ole16, Ole17, Ole18, Ole19, Ole20, Ole21, Ole22, Ole23, Ole24, Ole25, Ole26	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
víchrovníček azorský (buňňáček 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

Šesť párov primerov, pôvodne navrhnutých pre iné druhy z iných radov, som zaradila tiež do testovania, pretože pomocou *cross-species* PCR amplifikácie vykazovali polymorfizmus u druhov z radu rúrkonosce (viď tabuľka č. 4).

Tabuľka č. 4: Zoznam mikrosatelitov izolovaných z dvoch radov, a to bahniakov a spevavcov, testovaných na polymorfizmus u pelikána kučeravého.

Rad	Čeľaď	Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literárny zdroj
bahniaky (dlouhokřídli, Charadriiformes)	alkovité (alkovití, Alcidae)	svišťúň zrkadlový (alkoun obecný, <i>Cepphus guilemots</i>)	Cco5-21	Friesen <i>et al.</i> (2006)
	čajkovité (rackovití, Laridae)	čajka striebrohlavá (racek novozélandský, <i>Larus novaehollandiae</i> <i>scopulinus</i>)	RBG18, RBG18M, RBG29	Lawrence (2008) a Welch <i>et Fleischer</i> (2011) podľa Given <i>et al.</i> (2002)
	kulíkovité (kulíkovití, Charadriidae)	kulík morský (kulík mořský, <i>Charadrius</i> <i>alexandrius</i>)	Calex-01	Brown <i>et al.</i> (2009) podľa Küpper <i>et al.</i> (2007)
spevavce (pěvci, Passeriformes)	horárikovité (lesňáčkovití, Parulidae)	horárik zlatý (lesňáček žlutohý, <i>Dendroica petechia</i>)	Dpm01	Welch <i>et Fleischer</i> (2011) podľa Dawson <i>et al.</i> (1997)

4.6 PCR amplifikácia DNA

PCR amplifikácia bola prevedená na genomickej DNA šiestich nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého. Každá reakcia prebehla vždy s jedným párom primerom. V tabuľke č. 5 sú uvedené jednotlivé zložky PCR reakčnej zmesi.

Tabuľka č. 5: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre šesť vzoriek.

Zloženie PCR reakčnej zmesi	Objem [μ l]
deionizovaná voda	44,4
reakčný pufr 10x pre <i>aTaq</i> DNA polymerázu	6,7
roztok $MgCl_2$ (25 mmol/l)	4,0
roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7
primer R (10 μ mol/l)	3,3
primer F (10 μ mol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5U/ μ l)	1,0

Každá reakčná zmes bola pipetovaná po 9 μ l do 0,2ml mikroskúmavky, kde bola vopred napipetovaná genomická DNA po 1 μ l. PCR mikroskúmavky, každá s 10 μ l objemom, boli vložené do termocykleru. Časové a teplotné podmienky sú uvedené v schéme č. 1.

Schéma č. 1: Časové a teplotné podmienky PCR reakcie.

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

4.7 Spracovanie PCR produktov pomocou elektroforetickej separácie

Uvedený postup je optimalizovaný pre použitie vyhrievanej sekvenačnej elektroforetickej komôrky S2 Whatman Biometra, s rozmermi skiel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a hrúbkou gélu 0,4 mm.

1. Obe sklá dôkladne umyť vodou so saponátom a vydrhnúť kartáčikom. Strany skiel medzi ktorými bude gél, opláchnuť deionizovanou vodou, osušiť, dvakrát opláchnuť 96% etanolom a osušiť papierovou vreckovkou.
2. Väčšie sklo ošetriť na ploche, ktorá sa bude dotýkať gélu, prípravkom pre odpuzdovanie vody zo skiel automobilov (Rain-off), ten rozotrieť papierovou vreckovkou a nechať 5 min zaschnúť, potom opláchnuť deionizovanou vodou a osušiť papierovou vreckovkou.
3. Kratšie sklo ošetriť na ploche, ktorá sa bude dotýkať gélu, 1 ml roztoku 3-metakryloxypropyltrimetoxysilanu. Ten rozotrieť papierovou vreckovkou a nechať 5 min zaschnúť, potom štyrikrát opláchnuť 96% etanolom a vždy osušiť papierovou vreckovkou.
4. Na rovnú podložku v digestori (polystyrénová doska) umiestniť väčšie sklo ošetrenou plochou nahor, na ňu po stranách položiť 0,4 mm silné spacers a na ne položiť menšie sklo ošetrenou plochou dolu. Spacers umiestniť až do krajov skiel, gumu spaceru priložiť k menšiemu sklu, aby sa ho tesne dotýkala. Na jednej kratšej strane sú hrany skiel presne v zákryte, na protiahlejšej kratšej strane sú konce skiel vzájomne posunuté približne o 2,5 cm. V mieste spaceru, sklá na každej strane zopnúť dvoma klipsami.
5. V kadičke pripraviť 6% polyakrylamidový gél, premiešať, pomaly vlievať medzi sklá a rukou poklepávať na sklá, aby nedošlo k vzniku bublín.
6. Po vyplnení celého priestoru medzi sklami gélom, vsunúť medzi sklá v mieste, kde sa plnil tento priestor gélom, hrebienok jeho rovnou stranou asi 0,7 až 1 cm hlboko. V mieste hrebienku sklá zopnúť štyrmi klipsami a gél nechať najmenej hodinu polymerizovať.
7. Po stuhnutí gélu odstrániť všetky klipsy a sklá dôkladne umyť od zvyškov polyakrylamidu. Sklo potom osušiť papierovou vreckovkou a pevne upevniť pomocou šrobovacích úchyto v do elektroforetickej komôrky hranou s hrebienkom nahor a kratším sklom k hliníkovej doske elektroforetickej komôrky.
8. Katódový a anódový priestor zaliť 0,5x TBE pufrom, opatrne vytiahnuť hrebienok a vzniknutú medzeru medzi sklami dobre vyčistiť prúdom pufru z injekčnej striekačky. Katódový a anódový priestor uzavrieť, nasadiť elektródy a na zdroji jednosmerného elektrického prúdu ako limitný faktor nastaviť

hodnotu výkonu 90 W (hodnoty elektrického napätia a prúdu nastaviť na 3000 V/150 mA). Za týchto podmienok nechať gél predohriať asi 30 min.

9. Počas nahrievania pripraviť vzorky zmiešaním PCR produktu s 5 μ l nanášacieho pufru a pred nanášaním vzoriek do gélu, vložiť vzorky s pufrom na 3 min do denaturačných podmienok v termocykléri. Po vytiahnutí z termocykléru, mikroskúmavky so vzorkami opatrne vložiť do ľadovej drte, aby sa zabránilo renaturácií vlákien DNA produktov.
10. Behom denaturácie zatiaľ vypnúť zdroj elektrického prúdu, odpojiť katódu, otvoriť katódový priestor a znovu dobre vyčistiť prúdom pufru z injekčnej striekačky medzeru pre hrebienok od zvyškov polyakrylamidu a rozpustenej močoviny. Do tejto medzery medzi sklá vsunúť hrebienok, zúbky hrebienku asi 1 mm hlboko do gélu tak, aby nedošlo k ulomeniu niektorého zúbku.
11. Do medzier medzi zúbkami naniest' pipetou po 2 μ l vzoriek. Na všetky vzorky použiť rovnaké špičky, ktoré medzi nanášaním rozdielnych vzoriek je potrebné prečistiť niekoľkým nasatím a vypustením pufru z katódového priestoru pipetou. Po napipetovaní všetkých vzoriek, katódový priestor uzavrieť, nasadiť elektródu a na zdroji jednosmerného elektrického prúdu ako limitný faktor nastaviť hodnotu výkonu 70 W (hodnoty elektrického napätia a prúdu nastaviť na 3000 V/150 mA).
12. Čas separácie vzoriek závisí na molekulárnych hmotnostiach (dĺžkach) rozdeľovaných PCR produktov. Zvyčajná doba separácie vzoriek je 1,5 hodiny.
13. Behom elektroforetického delenia vzoriek pripraviť nasledujúce roztoky: fix/stop roztok, 1% roztok HNO_3 , 0,1% roztok AgNO_3 a vývojku, ktorá sa ako jediná umiestni do chladničky, aby sa vychladila na teplotu nižšiu ako 10 °C.
14. Po uplynutí času elektroforetického delenia vzoriek vypnúť elektrický prúd, odpojiť obe elektródy a koliečkom na pravej strane elektroforetickej komôrky otvoriť kanálik, ktorým pufr z katódovej časti pretečie do zberného priestoru, povoliť skrutky úchytov skiel a gél so sklami vybrať a položiť do vodorovnej polohy menším sklom nahor. Z priestoru medzi sklami opatrne vytiahnuť hrebienok i oba spacery a sklá od seba odpáčiť čepeľou noža.
15. Odchlípené menšie sklo s prilepeným gélom otočiť gélom nahor a uložiť do fotomisky, umiestniť na trepačku a zalíať fix/stop roztokom. Nechať pôsobiť min. 20 minút.

16. Fix/stop roztok zliať späť do banky a sklo s gélom premyť 3 krát po 2 min v 1 až 1,5 l deionizovanej vody. Následne roztok premyť roztokom HNO_3 na trepačke max. 5 min, po premytí roztok vyliat' a premyť 3 krát po 2 min v 1 až 1,5 l deionizovanej vody.
17. Sklo s gélom umiestniť na trepačku do roztoku AgNO_3 , do ktorého sa tesne pred použitím pridá 1,2 ml formaldehydu a tento roztok nechať na gél pôsobiť približne 30 minút.
18. Na konci tejto doby pripraviť jednu fotomisku s 1 až 2 l deionizovanej vody a druhú fotomisku s vychladenou vývojkou, do ktorej sa pridá 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
19. Fotomisku s gélom v roztoku AgNO_3 odobrať z trepačky a roztok zliať späť do zásobnej fľaše. Sklo s gélom vybrať a na 5 sekúnd ponoriť do misky s deionizovanou vodou a premiestniť do fotomisky s vývojkou umiestnenou na trepačke a sledovať vyvíjanie hnedočiernych, striebrom nafarbených, prúžkov PCR produktov.
20. Po dostatočne zreteľnom vyvíjaní a ešte pred tým, než začne vystupovať tmavé pozadie, vyvíjanie sfarbenia zastaviť priliatím uchovaného fix/stop roztoku z kroku č. 16 a nechať pôsobiť asi 2 minúty.
21. Sklo s gélom potom ponoriť asi na 2 min do deionizovanej vody a preniesť na 1 hod do sušiarne, kde sa gél pri 60 °C vysuší. Po vysušení sklo s gélom preniesť na negatoskop a vyhodnotiť.
22. Sklo s už nepotrebným gélom ponoriť na niekoľko minút až hodín do roztoku NaOH koncentrácií 1 mol/l, kedy sa gél kompletne odlepí od skla a po umytí je pripravené na ďalšie použitie.

5 Výsledky

V tejto bakalárskej práci som metódou *cross-species* PCR amplifikácie testovala polymorfne mikrosatelity na genomickej DNA šiestich nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého (*Pelecanus crispus*). Celkovo bolo použitých 213 mikrosatelitových párov primerov, z ktorých bolo 207 *de novo* izolovaných pre druhy z radu rúrkonosce. Konkrétne, bolo izolovaných 53 mikrosatelitov od druhov z čeľade albatrosovitá, 100 mikrosatelitov od druhov z čeľade víchrovníkovité a od druhov z čeľade víchrovníčkovité bolo odvodených 54 mikrosatelitov. Zvyšných 6 mikrosatelitov bolo izolovaných od zástupcov z radu bahniaky, 3 mikrosatelity pre čajku striebrohlavú, jeden pre kulíka morského a jeden pre svišťúňa zrkadlového. Jeden mikrosatelit bol charakterizovaný pre horárika zlatého z radu spevavce. Pri prevedení *cross-species* PCR amplifikácie, týchto 6 mikrosatelitov vykazovalo polymorfny produkt u druhov z radu rúrkonosce, preto som ich tiež zaradila do svojej analýzy.

U každého mikrosatelitu som vykonala PCR amplifikáciu, ktorej produkty som previedla na polyakrylamidový gél a následne boli vyhodnotené spoločne s vedúcim práce. Každá PCR reakcia prebiehala najprv pri teplote annealingu 50 °C. Pokiaľ PCR amplifikácia neposkytla žiadny produkt, teplotu annealingu som znižovala až na 46 °C. Naopak, pokiaľ PCR produkt poskytol príliš intenzívny a nehodnotiteľný výsledok, jednotlivé teploty annealingu sa podľa potreby zvyšovali. Najvyššia teplota dosiahla 67 °C. Taktiež, pre docielenie vyššieho rozlíšenia bolo niekedy potrebné predĺžiť čas elektroforetickej separácie až na 3 hodiny. Postupne som u každého mikrosatelitu určila jeho polymorfnosť, resp. monomorfnosť. U polymorfných mikrosatelitov som určila počet jednotlivých alel a celkový genotyp šiestich jedincov.

Analyzovala som všetkých 213 mikrosatelitov, z ktorých 12 poskytlo polymorfny produkt, 200 mikrosatelitov bolo monomorfnych a jeden mikrosatelit neposkytol vhodný produkt, preto bol z analýzy vylúčený. Konkrétne išlo o mikrosatelitový lokus De33, charakterizovaný od albatrosa s'ahovavého, ktorý aj po rôznych zmenách annealingovej teploty neposkytol optimálny produkt pre vyhodnotenie. Počet alel u všetkých polymorfnych lokusov sa pohyboval v rozmedzí 2 až 3. U jedného z nich, lokusu De19, boli pozorované dve miesta polymorfizmu, obe s dvoma alelami. Tento lokus bol izolovaný pre albatrosa sivohlavého. Všetky polymorfne lokusy, spolu s podmienkami testovania a vyhodnotením, sú uvedené v tabuľke č. 6.

Tabuľka č. 6: Charakteristika 12 polymorfných mikrosatelitových lokusov testovaných na 6 nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého. V tabuľke je uvedený názov mikrosatelitového lokusu spolu s kódom nachádzajúcim sa v databáze GenBank (Accession Number), zdrojový druh, sekvencia primerov, jednotka repetície, počet alel, annealingová teplota (T_a) a čas elektroforetickej separácie (ELFO).

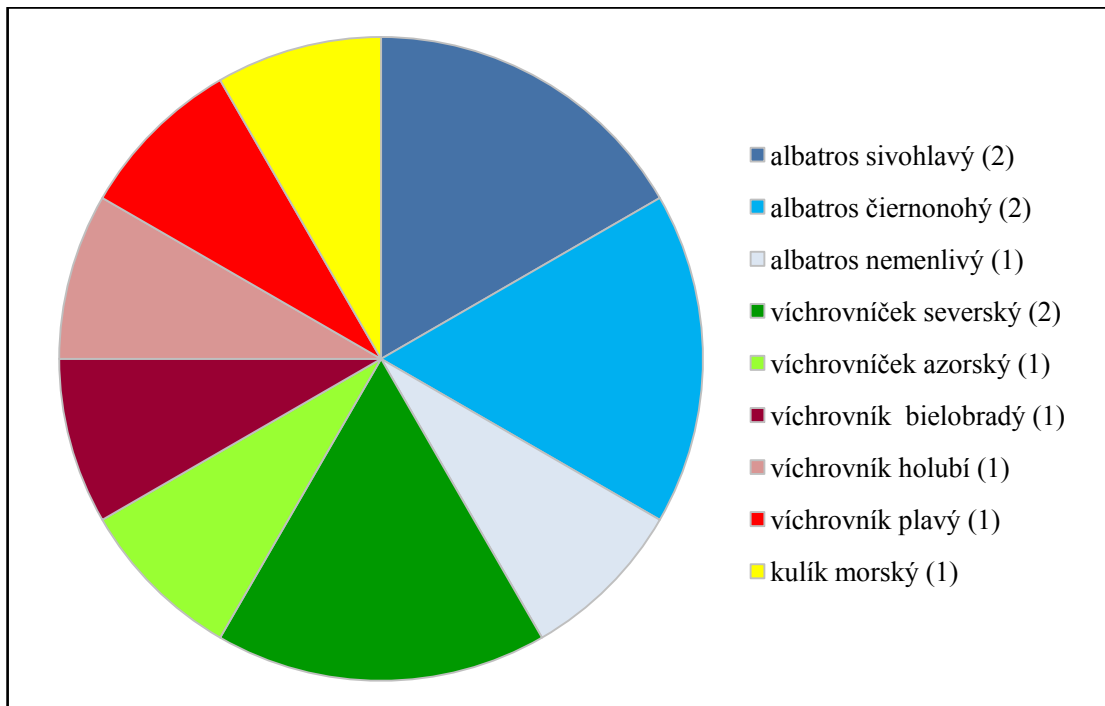
Názov lokusu (Accession No.)	Zdrojový druh	Sekvencia primerov (5' → 3')	Jednotka repetície	Počet alel	T_a [°C]	ELFO [min]
Bb21 (HM171897)	víchrovník holubí (<i>Bulweria bulwerii</i>)	F: CTGATGTTCCAGGCCCTAAT R: CCTCTGAGCCAGCTAATTCC	TG	2	59	180
BFAL4 (neuvedené)	albatros čiernonohý (<i>Thalassarche</i>	F: TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R: GTTTGCCATTTTAAACTGTCATTGGC	TC	2	55	90
BFAL14 (neuvedené)	<i>melanophris</i>)	F: CAAGAAGCTATTATTAAGCTATTTGTTCC R: GGGTGTGAAATCGTTTCTGC	ATTT	2	60	120
Cd1 (EU029083)	víchrovník plavý (<i>Calonectris diomedea</i>)	F: CAAGCAGTCAGAACTCTGTG R: TGAGTTTGCCCTACATGAAC	TG/TC	2	55	90
Dc19 (AF096800)	albatros sivohlavý (<i>Thalassarche</i>	F: GTCTCCACTGTCCAGCGTCT R: CAACTCCTTACAGACAAAGGC	CA	2+2	51	90
Dc31 (AF096810)	<i>chrysostoma</i>)	F: CTGACTCTCTGGGATGAGCC R: GTACCCCTGGAAAGCCAGAC	CA/GC	2	58	90
LAAL7 (neuvedené)	albatros nemenlivý (<i>Phoebastria immutabilis</i>)	F: CAGCATGACCAAATCCATCC R: GTTTGACACAAATGCCGTTCTTG	AGC	2	66	120
Ole03 (FR696379)	víchrovniček severský (<i>Oceanodroma leucorhoa</i>)	F: TCCTTCACCACCTCTTGCTGCC R: ACGCATCTGTAGCTCACAAATCCCAG	GAAA	2	62	180
Ole25 (FR696401)		F: CCTCCTCATCGTAGGGACTG R: TTAAAGGCAGCGATTCTGTTC	AGAT/ GAAA	3	66	120
Omn6 (JQ303230)	víchrovniček azorský (<i>O. monteiroi</i>)	F: AGCCTACACCAGCAGAAGGA R: CCATACAGGCAACAATCACG	CA	3	60	180
Paequ2 (AY371070)	víchrovník bielobrady (<i>O. castro</i>)	F: GCCTACTCCATCTTAATTGTG R: GGTTCCATACAGTTTCCTAGGTC	CA/TT	2	60	180
Calex-01 (AM072446)	kulík morský (<i>Charadrius alexandrius</i>)	F: CTTCTCCATTGTTGTCACCTCCAGT R: CTTGACTTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT/GA/GC	3	64	180

Z celkových 213 testovaných mikrosatelitových lokusov izolovaných pre druhy z radu rúrkonosce, bahniaky a spevavce, bolo polymorfných 12 mikrosatelitov. Úspešnosť *cross-species* PCR amplifikácie u pelikána kučeravého bola 5,6 %. Pre 11 polymorfných mikrosatelitov z 207 mikrosatelitových lokusov odvodených od druhov z radu rúrkonosce bola 5,3% úspešnosť.

Od zástupcov z radu rúrkonosce bolo v mojom experimente polymorfných 11 mikrosatelitov a jeden mikrosatelit bol polymorfný pre kulíka morského z radu bahniaky. Najviac polymorfných mikrosatelitov bolo od zástupcov z čeľade albatrosovité. Z celkových 53 izolovaných mikrosatelitov vykazovali polymorfnosť 5 mikrosatelitov. Úspešnosť u mikrosatelitov odvodených od zástupcov z čeľade albatrosovité bola 9,4 %. Z 54 izolovaných mikrosatelitov, odvodených od druhov z čeľade víchrovníčkovité, bola úspešnosť 5,6 %, pričom polymorfizmus vykazovali 3 mikrosatelity. Z čeľade víchrovníkovité, u ktorých bolo charakterizovaných 100 mikrosatelitov, boli polymorfné 3 mikrosatelity, čo činilo úspešnosť *cross-species* PCR amplifikácie 3 %. Z radu bahniaky bolo použitých na testovanie 5 mikrosatelitových lokusov, pričom iba jeden z nich vykazoval v mojom experimente polymorfizmus a to kulík morský. Mikrosatelit, odvodený od horárika zlatého patriaceho do radu spevavce, poskytol monomorfný produkt.

Spomedzi 12 polymorfných mikrosatelitov amplifikovaných u pelikána kučeravého je 41,7% zastúpenie mikrosatelitov z čeľade albatrosovité, 25% zastúpenie z čeľade víchrovníčkovité, a rovnako 25% zastúpenie pre zástupcov z čeľade víchrovníkovité. Zastúpenie mikrosatelitov pre druhy z radu bahniaky bolo 8,3%. Podrobný prehľad polymorfných mikrosatelitov rozdelených podľa druhov, z ktorých boli izolované patriacich do jednotlivých čeľadí, sú uvedené v grafe č. 1.

Graf č. 1: Prehľad 12 párov primerov, ktoré poskytli polymorfný produkt u pelikána kučeravého, farebne odlišených podľa druhu a jeho príslušnej čeľade, z ktorých boli izolované. Modrá farba predstavuje čeľaď albatrosovité, zelená patrí čeľadi víchrovníčkovité a červená čeľadi víchrovníkovité. Kulík morský, patriaci do radu bahniaky, je odlišený žltou farbou. Čísla v zátvorke uvádzajú počet polymorfných mikrosatelitov u jednotlivých druhov.



Z 12 párov primerov bolo amplifikovaných 13 polymorfných PCR produktov, nakoľko jeden pár primerov, konkrétne Dc19, amplifikoval dve miesta polymorfizmu. Počet alel v polymorfných PCR produktoch sa pohyboval v rozmedzí 2 až 3. U 10 z nich, boli u každého PCR produktu detekované 2 alely, zvyšné tri PCR produkty obsahovali po 3 alely.

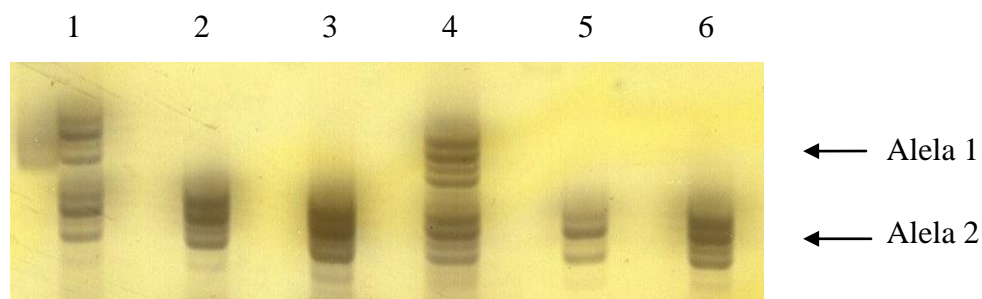
Cross-species PCR amplifikácia 12 polymorfných mikrosatelitov prebiehala na 6 nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého. Ich jednotlivé genotypy sú uvedené v tabuľke č. 7. V tejto tabuľke je tiež zahrnutý lokus Dc19, u ktorého boli pozorované dve polymorfné miesta.

Tabuľka č. 7: Prehľad 13 genotypov 6 nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého amplifikovaných 11 párami primerov z radu rúrkonosce a jedným párom primerov od kulíka morského z radu bahniaky.

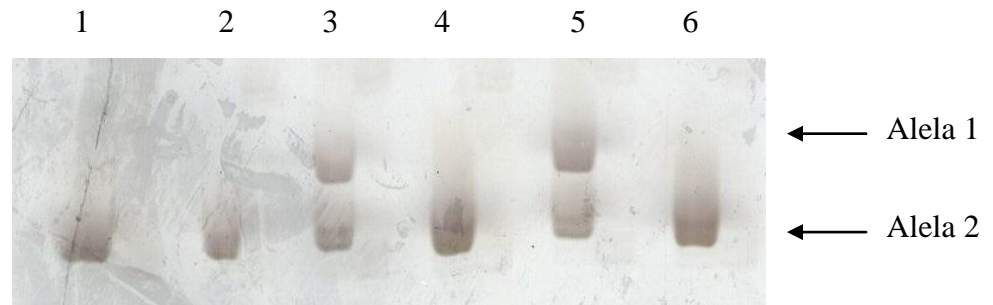
Lokus	Zdrojový druh	Počet alel	Genotypy
Bb21	víchrovník holubí	2	2/2 1/1 1/2 2/2 1/1 1/1
BFAL4	albatros čiernonohý	2	2/2 1/1 1/1 1/1 2/2 2/2
BFAL14		2	1/2 2/2 1/2 1/2 1/2 1/2
Cd1	víchrovník plavý	2	1/2 2/2 2/2 1/2 2/2 2/2
Dc19	albatros sivohlavý	2+2	2/2 1/2 1/2 2/2 2/2 1/2
			2/2 1/2 2/2 2/2 2/2 2/2
Dc31		2	1/2 2/2 2/2 2/2 2/2 1/2
LAAL7	albatros nemenlivý	2	2/2 2/2 1/2 2/2 1/2 2/2
Ole03	víchrovníček severský	2	1/1 1/2 1/2 1/1 1/1 1/1
Ole25		3	1/1 2/2 2/2 3/3 2/2 2/3
Omn6	víchrovníček azorský	3	1/2 3/3 2/3 1/2 2/2 2/2
Paequ2	víchrovník bielobradý	2	2/2 1/1 1/1 2/2 2/2 1/2
Calex-01	kulík morský	3	1/2 1/3 1/1 1/1 1/1 1/3

Na nasledujúcich fotografiách sú výsledky *cross-species* PCR amplifikácie a elektroforetickej separácie zobrazené v polyakrylamidovom géle. Konkrétne ide o mikrosatelitové lokusy Cd1 (viď obrázok č. 3) a LAAL7 (viď obrázok č. 4).

Obrázok č. 3: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Cd1 amplifikovaného pri T_a 55 °C u 6 nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého, u ktorého boli detekované 2 alely. Čísla predstavujú jednotlivých jedincov.



Obrázok č. 4: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu LAAL7 amplifikovaného pri T_a 66 °C u 6 nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého, u ktorého boli detekované 2 alely. Čísla predstavujú jednotlivých jedincov.



6 Diskusia

V tejto bakalárskej práci bolo metódou *cross-species* PCR amplifikácie testovaných celkovo 213 mikrosatelitov, 207 mikrosatelitových lokusov izolovaných *de novo* od zástupcov z radu rúrkonosce a 6 mikrosatelitových lokusov odvodených od druhov patriacich do radov bahniaky a spevavce, na DNA 6 nepříbuzných jedincov pelikána kučeravého. Dvanásť mikrosatelitov bolo vyhodnotených ako polymorfných s dvoma až troma alelami. Jeden z nich, mikrosatelit Dc19, amplifikoval produkt v dvoch polymorfných oblastiach, v oboch s dvoma alelami.

Od zástupcov patriacich do čeľade albatrosovité bolo charakterizovaných 53 mikrosatelitov od siedmich druhov rodu albatros. V mojej práci, u pelikána kučeravého, vykazovalo polymorfizmus 5 lokusov, dva z nich izolované od albatrosa sivohlavého (*Diomedea chrysostoma*), dva mikrosatelitové lokusy navrhnuté pre albatrosa čiernonohého (*Phoebastria nigripes*) a jeden pre albatrosa nemenlivého (*P. immutabilis*).

Burg (1999) charakterizovala 26 mikrosatelitových lokusov pre dva druhy, albatrosa sťahovavého a albatrosa sivohlavého. Všetky lokusy boli amplifikované PCR reakciou využívajúcou dve rôzne annealingové teploty, pričom pri T_{a1} prebiehalo prvých 7 cyklov a pri T_{a2} zvyšných 25 cyklov. U lokusu Dc19, testovaného u 50 jedincov albatrosa sivohlavého, boli autorkou nájdené 3 alely pri T_{a1} 48 °C a T_{a2} 52 °C. U pelikána kučeravého som detekovala dve polymorfné miesta pri T_a 51 °C, každé z nich malo dve alely. Pre rovnaké druhy ako v prvom prípade a za rovnakých annealingových teplôt bol autorkou testovaný lokus Dc31. Ani v jednom z nich lokus nevykazoval polymorfizmus. Naopak, u pelikána kučeravého som pri teplote T_a 58 °C pozorovala dve alely. *Cross-species* PCR amplifikáciou boli tieto lokusy otestované aj na 50 jedincoch albatrosa čiernobrvého. Zatiaľ čo lokus Dc31 ostal monomorfným aj pre tento druh, u lokusu Dc19 sa prejavilo 5 alel.

Pre albatrosa čiernonohého, nemenlivého a bielochrbtého (*Phoebastria albatrus*) navrhli Hernandez *et al.* (2014) 15 polymorfných mikrosatelitov. Každý lokus bol autormi testovaný pri T_a 60 °C na 36 jedincoch albatrosa čiernonohého, 12 jedincoch albatrosa nemenlivého a 3 jedincoch albatrosa bielochrbtého. Mikrosatelit, BFAL14, amplifikovaný na DNA pelikána kučeravého pri T_a 60 °C bol polymorfný, pričom som pozorovala dve alely. U zdrojového druhu, albatrosa čiernonohého, boli autormi pozorované 4 alely a u ďalších dvoch albatrosov po 3 alelách. U mikrosatelitového

lokusu BFAL4 bolo v zdrojovom druhu detekovaných 8 alel. *Cross-species* PCR amplifikáciou u pelikána kučeravého som detekovala 2 alely pri T_a 55 °C. U albatrosa nemenlivého boli u lokusu LAAL7 nájdené 4 alely, rovnako ako u albatrosa čiernonohého. Pre albatrosa bielochrbtého bol tento lokus polymorfný s 2 alelami, rovnako ako pri amplifikácii u pelikána kučeravého, avšak pri odlišnej annealingovej teplote 66 °C.

Sto mikrosatelitových lokusov bolo izolovaných pre druhy patriace do čeľade víchrovníkovité. *Cross-species* PCR amplifikáciou boli u pelikána kučeravého zistené 3 polymorfné lokusy odvodené pre víchrovníka bielobradého (*Procellaria aequinoctialis*), víchrovníka plavého (*Calonectris diomedea*) a víchrovníka holubieho (*Bulweria bulwerii*).

Techow *et al.* (2004) charakterizovali šesť mikrosatelitových lokusov pre víchrovníka bielobradého. U jedného z nich, Paequ2, som u pelikána kučeravého pri T_a 60 °C pozorovala dve alely. Naopak, u zdrojového druhu autori našli u 94 jedincov pri T_a 54 °C 4 alely. Daný mikrosatelitový lokus bol autormi tiež testovaný *cross-species* PCR amplifikáciou u ďalších šiestich druhov: albatrosa s'ahovavého, albatrosa čiernobrvého, albatrosa sivohlavého, víchrovníka okuliarnatého (*Procellaria conspicillata*), plavca veľkého (*Macronectes giganteus*) a plavca tmavého (*M. hallis*). Polymorfizmus lokusu Paequ2 bol detekovaný u všetkých druhov, výnimkou boli plavec veľký a plavec tmavý. Počet alel nebol uvedený.

Bried *et al.* (2008) objavili jedenásť polymorfných dinukleotidových mikrosatelitov pre víchrovníka plavého. Po otestovaní u 6 jedincov pelikána kučeravého bol jeden z nich polymorfný. Konkrétne išlo o lokus Cd1, u ktorého boli pri T_a 55 °C pozorované 2 alely. U zdrojového druhu bol tento lokus testovaný autormi na 43 jedincoch, u ktorých vykazoval pri T_a 58 °C 6 alel. Následne bol tento mikrosatelitový lokus ešte testovaný u albatrosa s'ahovavého, u ktorého sa tiež prejavil polymorfizmus. U víchrovníka holubieho bol PCR produkt vyhodnotený ako monomorfný a u víchrovníka bielobradého nebol PCR produkt vôbec amplifikovaný.

Andris *et al.* (2010) izolovali pre víchrovníka holubieho jedenásť mikrosatelitov. Lokus Bb21, testovaný u 91 jedincov zdrojového druhu pri T_a 58 °C, obsahoval 3 alely. Po *cross-species* PCR amplifikácií u pelikána kučeravého sa tento lokus pri T_a 59 °C prejavil tiež ako polymorfný, u ktorého som detekovala 2 alely. Polymorfizmus tohto lokusu sa ukázal aj u hladinára modrého (*Halobaena caerulea*) a ako monomorfný bol

charakterizovaný pre víchrovníka bielobradého. U víchrovníčka azorského *cross-species* PCR amplifikácia mikrosatelitového lokusu neprebehla.

Z čeľade víchrovníčkovité bolo charakterizovaných 54 mikrosatelitov pre tri druhy: víchrovníčka severského (*Oceanodroma leucorhoa*), víchrovníčka černastého (*Oceanodroma castro*) a víchrovníčka azorského (*Oceanodroma monteiroi*). U pelikána kučeravého boli polymorfne 3 mikrosatelity, 2 od víchrovníčka severského a jeden od víchrovníčka azorského.

Pre víchrovníčka severského Bicknell *et al.* (2011) charakterizovali 26 polymorfnych mikrosatelitov. Dva z nich vykazovali polymorfnosť aj u 6 jedincov pelikána kučeravého. Išlo o lokus Ole03, u ktorého som pri T_a 62 °C detekovala 2 alely a lokus Ole25, kde som pri T_a 66 °C pozorovala 3 alely. U zdrojového druhu 24 jedincov pri T_a 60 °C, bol počet alel u Ole03 12, u Ole25 bolo nájdených 7 alel.

Bried *et al.* (2012) popísali 18 nových polymorfnych mikrosatelitových markerov pre víchrovníčka azorského. Autori testovali variabilitu na 125 jedincoch pri T_a 58 °C. Pre lokus Omn6 bolo nájdených 9 alel. U pelikána kučeravého na 6 jedincoch pri T_a 60 °C som pozorovala 3 alely. *Cross-species* PCR amplifikáciou bol tento lokus analyzovaný aj u víchrovníčka černastého, víchrovníka holubieho a hladinára modrého. Úspešná PCR amplifikácia prebehla len u víchrovníčka černastého, u ktorého boli nájdené 3 alely.

V rámci radu bahniaky len 1 lokus vykazoval polymorfizmus po prevedení *cross-species* PCR amplifikácie u pelikána kučeravého. Jednalo sa o lokus Calex-01, pôvodne izolovaný pre kulíka morského, u ktorého pri T_a 64 °C boli pozorované 3 alely, zatiaľ čo Küpper *et al.* (2007) u 42 jedincoch zdrojového druhu pri nižšej T_a , 62 °C, pozorovali až 10 alel.

Nedvědová (2015) testovala všetkých 213 mikrosatelitov izolovaných od zástupcov patriacich do radov rúrkonosce, bahniaky a spevavce u 6 nepríbuzných jedincov myktérie lysohlavej (*Mycteria leucocephala*, česky nesyt indomalajský), ktorá patrí do radu brodivce. Celkom detekovala 46 polymorfnych lokusov s 2–5 alelami.

U šiestich nepríbuzných jedincov potápky chochlatej (*Podiceps cristatus*, česky potápka roháč) bolo opäť pomocou *cross-species* PCR amplifikácie testovaných všetkých 213 mikrosatelitov Janušovou (2015), z ktorých bolo 20 polymorfnych s 2–8 alelami.

Pomocou *cross-species* PCR amplifikácie bolo 213 daných mikrosatelitov testovaných aj u 6 nepríbuzných jedincov plameniaka červeného (*Phoenicopterus ruber*, česky plameňák karibský) (Strejčková, 2016) a plameniaka ružového (*Phoenicopterus ruber*, česky plameňák ružový) (Kůrová, 2017). U plameniaka červeného bolo polymorfných 50 mikrosatelitových lokusov, u plameniaka ružového zasa 49 polymorfných mikrosatelitových lokusov. U oboch druhov sa počet alel pohyboval v rozmedzí 2–5.

Najvyššia úspešnosť *cross-species* PCR amplifikácie mikrosatelitov, odvodených od zástupcov patriacich do radov rúrkonosce, bahniaky a spevavce, bola pozorovaná u plameniaka červeného, 23,5 %, a plameniaka ružového, 23 %. Menšiu mieru úspešnosti, 21,6 %, vykazovala myktéria lysohlavá. U potápky chochlatej bola najnižšia, 9,4% miera úspešnosti.

V tabuľke č. 8 je prehľad polymorfných mikrosatelitových lokusov testovaných u pelikána kučeravého porovnaný s ďalšími štyrmi druhmi, u ktorých boli tieto mikrosatelitové lokusy tiež testované pomocou *cross-species* PCR amplifikácie. Mikrosatelitový lokus Bb21 vykazoval polymorfizmus takmer u všetkých druhov, výnimkou bola myktéria lysohlavá.

Tabuľka č. 8: Prehľad mikrosatelitových lokusov, izolovaných od druhov patriacich do radov rúrkonosce a bahniaky, ktoré vykazovali polymorfizmus resp. monomorfizmus u jednotlivých testovaných druhoch. Čísla uvádzajú počet alel, monomorfne lokusy sú označené písmenom M.

Mikrosatelit	Druh, u ktorého prebehla <i>cross-species</i> PCR amplifikácia				
	Pelikán kučeravý	Myktéria lysohlavá	Potápka chochlatá	Plameniak červený	Plameniak ružový
Bb21	2	M	5	2	2
BFAL4	2	2	M	2	M
BFAL14	2	M	M	3	M
Cd1	2	4	M	M	M
Dc19	2 + 2	M	M	M	M
Dc31	2	M	M	3	2
LAAL7	2	M	M	5	3
Ole03	2	M	M	M	M
Ole25	3	3	M	M	M
Omn6	3	M	M	M	M

Tabuľka č. 8: Pokračovanie.

Mikrosatelit	Druh, u ktorého prebehla <i>cross-species</i> PCR amplifikácia				
	Pelikán kučeravý	Myktéria lysohlavá	Potápka chochlata	Plameniak červený	Plameniak ružový
Paequ2	2	M	M	M	M
Calex-01	3	2	M	M	2

Pre nájdenie viac polymorfných mikrosatelitových lokusov u pelikána kučeravého by bolo vhodné v budúcnosti otestovať viac mikrosatelitov, odvodených od druhov zo skupiny *Aequorlornithes* a previesť experiment na viacero jedincov kvôli získaniu spoľahlivejších výsledkov.

7 Záver

Vo svojej bakalárskej práci som pomocou *cross-species* PCR amplifikácie testovala 213 mikrosatelitových lokusov na DNA 6 nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého. Z 213 bolo 207 mikrosatelitových lokusov navrhnutých *de novo* pre druhy z radu rúrkonosce (Procellariiformes). Konkrétne, 100 mikrosatelitov bolo odvodených od zástupcov z čeľade víchrovníkovité (Procellariidae), 54 od zástupcov z čeľade víchrovníčkovicité (Hydrobatidae) a z čeľade albatrosovicité (Diomedidae) bolo odvodených 53 mikrosatelitov. Ďalej bolo testovaných 6 mikrosatelitových lokusov, ktoré boli odvodené od štyroch druhov patriacich do dvoch ďalších radov, avšak u druhov z radu rúrkonosce vykazovali polymorfizmus. Išlo o 5 mikrosatelitov odvodených z radu bahniaky (Charadriiformes), patriacich do čeľadí alkovicité (Alcidae), čajkovité (Laridae) a kulíkovité (Charadriidae). Jeden mikrosatelit bol odvodený od horaríka zlatého (*Dendroica petechia*) z radu spevavce (Passeriformes).

Cross-species PCR amplifikáciou som pre pelikána kučeravého našla 12 polymorfných mikrosatelitov. U jedného z nich som detekovala dve miesta polymorfizmu, v oboch po 2 alelách. Jedenásť mikrosatelitov bolo odvodených od zástupcov z radu rúrkonosce a 1 polymorfný mikrosatelit bol odvodený kulíka morského (*Charadrius alexandrius*) z radu bahniaky. U všetkých mikrosatelitov boli celkovo detekované 2–3 alely.

Úspešnosť *cross-species* PCR amplifikácie 207 mikrosatelitov odvodených od zástupcov z radu rúrkonosce u pelikána kučeravého bola 5,3 %. Najväčšiu úspešnosť, 9,4 % vykazovali mikrosatelity odvodené od zástupcov z čeľade albatrosovicité, kde bolo polymorfných 5 mikrosatelitov. Tri polymorfné mikrosatelity odvodené od zástupcov z čeľade víchrovníčkovicité vykazovali úspešnosť 5,6 %. Najmenšia úspešnosť činila 3 %, s celkovými tromi polymorfnými mikrosatelitmi odvodenými od zástupcov z čeľade víchrovníkovité.

8 Literatúra

Alderton, D. (1995): Ptáci. Nakladatelský dům OP, Praha.

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, publikované online na <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>, navštívené dňa 6.3.2018.

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.

Bourdon, E. (2005): Osteological evidence for sister group relationship between pseudo-toothed birds (Aves: Odontopterygiformes) and waterfowls (Anseriformes). Naturwissenschaften 92, 586–591.

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

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

Brown, L. H., Urban, E. K., Newman, K. (1982): The birds of Africa, Volume I, Academic Press Limited, London.

- Brown, J. W., Rest, J.S., Garcí'a-Moreno, J., Sorenson, M. D., Mindell, D. P. (2008): Strong mitochondrial DNA support for a Cretaceous origin of modern avian lineages. *BMC Biology*, 6, 6.
- 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.
- Burnie, D. (2002): *Zvíře*. Knížní klub, Praha.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica patechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*, 79, 506–514.
- Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, Á., Krupa, A. P., Lee, J.-W., Martín-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L. G., Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.
- Dover, G. A. (1982): Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*, 299, 111–117.
- 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. (1992): Mechanistic basis for microsatellite instability. Oxford University Press, Oxford.
- Ellegren, H., Primmer, C. R., Sheldon, B. C. (1995): Microsatellite 'evolution': directionality or bias? *Nature Genetics*, 11, 361–362.
- Field, D., Wills, C. (1998): Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Biological Science*, 263, 209–215.
- Friesen, V. L., Smith, A. L., Gómez-Díaz, E. (2007): Sympatric speciation by allochrony in seabird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18589–18594.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): *Zoologie obratlovců*. Academia, 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. *Methods in Enzymology*, 395, 202–222.
- Goldstein, D., Schlotterer, C. (1999): *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford.
- Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwater, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1044–1046.
- Gosler, A. (1994): *Atlas ptáků světa*, Příroda, Bratislava.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C., Ramesh, B. (1999): Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed*, 118, 369–390.
- 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.

Hancock, J. M., (1995): The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 1038–1047.

Hancock, J. M., (1996): Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays*, 12, 421–425.

Hanzák, J. (1974): Velký obrazový atlas ptáků. Artia, Praha.

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. *Proc Natl Acad Sci USA* 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., Šťastný, K. a kol. (2016): Fauna ČR, Ptáci 1, Academia, Praha.

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

Janušová, D. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knižnica 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 Evolution*. 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.

Küpper, C., Horburgh, G. J., Dawson, D. A., French-Constant, R., Szekely, T., Burke, T. (2007): Characterization of 36 polymorphic microsatellite loci in the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) including two sex-linked loci and their amplification in four other *Charadrius* species. *Molecular Ecology Notes*, 7, 35–39.

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. Dissertation. Auckland, Nový Zéland, publikované online na: <http://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>, navštívené dňa 1. 3. 2018.

- Levinson, G., Gutman, G. A. (1987): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 203–221.
- Malausa, T., Gilles, A., Megléc, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., Dubut, V., Pech, N., Castagnone-Sereno, P., Délye, Ch., Feau, N., Frey, P., Gauthier, P., Guillemaud, T., Hazard, L., Corre, V., Lung-Escarmant, B., Malé, P.-J. G., Ferreira, S., Martin, J.-F. (2011): High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*, 11, 638–644.
- Marchant, S., Higgins, P. J. (1990): *Handbook of Australian, New Zealand and Antarctic Birds. Volume 1, Ratites to Ducks*. Melbourne, Victoria: Oxford University Press. 737–738.
- Mayr, G. (2003): The phylogenetic affinities of the shoebill (*Balaeniceps rex*). *Journal of Ornithology*, 144, 157–175.
- Mayr, G. (2005): Tertiary ptopterids (Aves, Ptopteridae) and a novel hypothesis on the phylogenetic relationships of penguins (Spheniscidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 10, 1–11.
- Megléc, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N., Martin, J.-F. (2010): QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26, 403–404.
- Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimanda, G. K., Thali, M. R., Alderman, R., Cuthbert, R. J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Phillips, R. A., Ryan, P. G., Suazo, C. G., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046–1058.
- Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M., Hetzel, D. J. (1991): The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10, 654–660.

Nedvědová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knížnica biologických oborov PřF UPOL Olomouc.

Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.

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

Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Møller, A. P., Ellegren, H. (1997): Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research*, 7, 471–482.

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

Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.

Quillfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153, 367–373.

Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer 3 on the WWW for general users and for biologists programmers. In: Miesner S, Krawetz SA (eds.) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Human Press Inc., Totowa, 365–386.

Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365–371.

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.

- Sia, E. A., Butler, C.A., Dominska, M., Greenwell, P., Fox, T. D., Petes, T. D. (2000): Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 250–255.
- Smith, G. P. (1973): Unequal crossover and the evolution of multigene families. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 38, 507–513.
- Smith, G. P. (1976): Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, 191, 528–535.
- Smith, N. D. (2010): Phylogenetic Analysis of Pelecaniformes (Aves) Based on Osteological Data: Implications for Waterbird Phylogeny and Fossil Calibration Studies. *PLoS ONE*, 5, e13354.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.
- Tachida, H., Iizuka, M. (1992): Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics*, 131, 471–478.
- 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.
- Warheit, K. I. (2001): The seabird fossil record and the role of paleontology in understanding seabird community structure. In: Schreiber EA, Burger J (eds.) *Biology of Marine Birds*. CRC Press. New York, 17–56.

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 Edicions, Barcelona.

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology, 11, 1–16.