

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2010

Veronika Mikulová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Mikrosatelitové lokusy pro determinaci
paternity u vybraných druhů pelikánů
(*Pelecanus* spp.)**

Diplomová práce

Veronika Mikulová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvořníka, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 4. 5. 2010

Práce vznikla za finanční podpory Vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (IGA UPOL) v rámci projektu PrF_2010_052 „Mezidruhová amplifikace polymorfních DNA mikrosatelitů u vodních ptáků“.

Děkuji pracovníkům Zoologické zahrady ve Dvoře Králové nad Labem za poskytnutí vzorků krve pro výzkum pelikánů v této diplomové práci.

Děkuji RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho pomoc při práci v laboratoři, čas, vstřícnost, vysvětlení problematiky, trpělivost, ochotu, motivaci k práci a poskytnutí materiálů.

Souhrn

Cross-species mikrosatelitová amplifikace je velmi vhodná metoda pro hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů. Pomocí amplifikace DNA technikou PCR s použitím *cross-species* primerů se hledají polymorfní mikrosatelitové lokusy, které je možné použít ke genetické analýze a k studiu paternity. Tato práce testuje metodou *cross-species* mikrosatelitové amplifikace na pelikánu africkém (*Pelecanus rufescens*), pelikánu kadeřavém (*P. crispus*), pelikánu bílém (*P. onocrotalus*) a pelikánu skvrnozobém (*P. philippensis*) 58 párů primerů odvozených z DNA kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), ibise japonského (*Nipponia nippon*), plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), pelikána bílého a zebu indického (*Bos indicus*). Primery odvozené z DNA kormorána galapážského byly testovány na pelikánu skvrnozobém již v bakalářské práci Mikulová (2008). Dále práce testuje na pelikánu bílém a skvrnozobém dalších 126 párů primerů odvozených z DNA kolpíka malého (*Platalea minor*), tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*), čápa bílého (*Ciconia ciconia*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), tereje modronohého (*Sula nebouxii*), alkounka drobného (*Aethia pygmaea*), plameňáka karibského, potáplice lední (*Gavia immer*), fregatky obecné (*Fregata minor*), volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) a kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*). U pelikána bílého, kde jsou amplifikace nejúspěšnější, je ještě navíc testováno dalších 13 párů primerů odvozených z DNA kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), kajky mořské (*Somateria mollissima*), kachnice laločnaté (*Biziura lobata*) a pižmovky velké (*Cairina moschata*).

U pelikána afrického a kadeřavého bylo nalezeno devět polymorfních mikrosatelitových lokusů. U pelikána bílého bylo nalezeno 39 polymorfních mikrosatelitových lokusů a u dalších 10 mikrosatelitových lokusů, odvozených od pelikána bílého, byl ověřen polymorfismus. Polymorfní lokusy nalezené u těchto druhů pelikánů navrhuji pro další paternitní studium. U pelikána skvrnozobého bylo nalezeno celkem 31 polymorfních mikrosatelitových lokusů (vč. bakalářské práce Mikulová, 2008), u kterých byly zjištěny počty alel u 17 jedinců a vypočítány jejich charakteristiky. Na základě genotypizace těchto polymorfních lokusů byla ověřena paternita šesti dospělců a jejich 11 mládřat.

Summary

Cross-species microsatellite amplification is very suitable method for searching polymorphic microsatellite loci. Polymorphic microsatellite loci are searching on the basis of DNA amplification by PCR technique using cross-species primers, that is possible use for genetic analyses and paternity studies. This thesis tests 58 pairs of primers derived from DNA of Flightless Cormorant (*Phalacrocorax harrisi*), Crested Ibis (*Nipponia nippon*), Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber*), American White Pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*), Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and Indian Zebu (*Bos indicus*) on Pink-backed Pelican (*Pelecanus rufescens*), Dalmatian Pelican (*P. crispus*), Great White Pelican and Spot-billed Pelican (*P. philippensis*) by cross-species microsatellite amplification method. Primers derived from DNA of Flightless Cormorant were tested on Spot-billed Pelican in bachelor thesis Mikulová (2008). Furthermore, thesis tests on Great White Pelican and Spot-billed Pelican other 126 pairs of primers derived from DNA of Black-faced Spoonbill (*Platalea minor*), Adelie Penguin (*Pygoscelis adeliae*), White Stork (*Ciconia ciconia*), Black-crowned Night-Heron (*Nycticorax nycticorax*), Blue-footed Booby (*Sula nebouxii*), Whiskered Auklet (*Aethia pygmaea*), Caribbean Flamingo, Great Northern Diver (*Gavia immer*), Great Frigatebird (*Fregata minor*), Chinese Egret (*Egretta eulophotes*) and Double-crested Cormorant (*Phalacrocorax auritus*). In addition, for Great White Pelican, where are the most successful amplifications, were tested other 13 pairs of primers derived from DNA of Peking Duck (*Anas platyrhynchos*), Common Eider (*Somateria mollissima*), Musk Duck (*Biziura lobata*) and Muscovy Duck (*Cairina moschata*).

In Pink-backed Pelican and Dalmatian Pelican were found nine polymorphic microsatellite loci. In Great White Pelican were found 39 polymorphic microsatellite loci and in other 10 microsatellite loci, derived from Great White Pelican, was acknowledged polymorphics. Polymorphic loci found for these species of *Pelecanus* I suggest for following paternity studies. In Spot-billed Pelican were found 31 polymorphic microsatellite loci in all (incl. bachelor thesis Mikulová, 2008), by that numbers of alleles in 17 individuals were stated and were calculated their characteristics. On the basis of genotyping was verified paternity in six adults and their 11 youngs.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíle práce	8
3	Literární přehled.....	9
3.1	Čeď pelikánovitých	9
3.2	Molekulární vs. morfologické studie v řádu veslonohých	13
3.3	Studium mikrosatelitových lokusů v řádu veslonohých	17
3.4	Studium vnitrodruhové příbuznosti u ptáků.....	18
3.4.1	Mikrosatelitová DNA.....	18
3.4.2	<i>Cross-species</i> mikrosatelitová amplifikace.....	19
3.4.3	Univerzální EST mikrosatelitové sekvence	20
4	Materiál a metody	22
4.1	Izolace genomické DNA pro PCR z krve ptáků	22
4.2	Hledání vhodných mikrosatelitových markerů analýzou <i>cross-species</i> mikrosatelitové DNA	22
4.2.1	Podmínky PCR amplifikace DNA	25
4.2.2	Zpracování PCR produktů	26
4.2.3	Použité chemikálie	28
4.2.4	Použité roztoky	29
4.2.5	Použité laboratorní přístroje.....	32
5	Výsledky.....	33
6	Diskuze	54
7	Závěr	62
8	Seznam zkratk	63
9	Použitá literatura	64

1 Úvod

Mikrosatelity jsou genetické markery vhodné pro stanovení rodičovství a dalších genetických vztahů mezi jedinci. Mikrosatelitová DNA se amplifikuje technikou PCR použitím *cross-species* primerů různých taxonů a amplifikáty se následně separují pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu.

Tato práce se zabývá hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů metodou *cross-species* mikrosatelitové amplifikace pro determinaci paternity u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), kadeřavého (*P. crispus*), bílého (*P. onocrotalus*) a skvrnozobého (*P. philippensis*). Ve své práci testují polymorfismus mikrosatelitové DNA s primery odvozenými z DNA kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), ibise japonského (*Nipponia nippon*), kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), kajky mořské (*Somateria mollissima*), kachnice laločnaté (*Biziura lobata*), pižmovky velké (*Cairina moschata*), plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), pelikána bílého, kolpíka malého (*Platalea minor*), tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*), čápa bílého (*Ciconia ciconia*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), tereje modronohého (*Sula nebouxii*), alkounka drobného (*Aethia pygmaea*), potáplice lední (*Gavia immer*), fregatky obecné (*Fregata minor*), volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*) a zebu indického (*Bos indicus*).

U pelikána skvrnozobého je plánováno určení statistických charakteristik všech mikrosatelitů, které jsou u něho polymorfní a analýza příbuzenských vztahů ve skupině 17 jedinců pelikána skvrnozobého chovaných v Zoologické zahradě ve Dvoře Králové nad Labem.

2 Cíle práce

- 1) Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
- 2) *Cross-species* testy mikrosatelitových lokusů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), kadeřavého (*P. crispus*), bílého (*P. onocrotalus*) a skvrnozobého (*P. philippensis*), které byly dříve popsány jako polymorfní u ptáků řádů brodivých, plameňáků, potápek, potáplic, tučňáků a veslonohých.
- 3) Charakteristika nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*).
- 4) Analýza polymorfních mikrosatelitových lokusů a sestavení rodokmenu pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) pro chovnou skupinu šesti dospělců a 11 mláďat ze Zoologické zahrady ve Dvoře Králové nad Labem.

3 Literární přehled

3.1 Čeleď pelikánovitých

Pelikáni jsou nejtěžší létající ptáci patřící do řádu veslonohých. Mohutný, hluboko rozeklaný zobák i extrémně roztažitelný hrdelní vak pod spodní čelistí jsou adaptací na chytání ryb, které jsou jejich téměř jedinou potravou. Vak je velmi objemný, vejde se do něj až 14 l vody a v horkém počasí se jím pelikáni zbavují přebytečného tepla. Mají redukované vnější nozdry, zakrnělý jazyk, roztažitelný jícen a žaludek, tvrdé a husté opeření a silně vyvinutou kostrční žlázu.

Kostra i tělo jsou silně pneumatizované, všechny kosti, včetně drobných článků prstů, jsou duté, vzdušné vaky se nacházejí až pod kůži a mírní náraz těla při pádu na hladinu. Nohy jsou veslovací, krátké a posunuty dozadu, což umožňuje výkonné pádlování, ovšem znesnadňuje pohyb po souši. Všechny čtyři prsty jsou spojeny plovací blánou. Křídla jsou dlouhá, široká a umožňují výborně plachtit. Pelikáni dokážou letět bez zastávky až 24 hodin, za které uletí až 500 km. Létají v klínových formacích nebo dlouhých řadách, přičemž se všichni řídí pohyby vůdčího ptáka.

Zajímavostí je společný lov ryb, kdy skupina 8-12, někdy však až 40 pelikánů, vytvoří podkovovitou formaci a natlačuje ryby na mělčinu, přičemž každých 15-20 sekund rozevírají křídla, jednotně ponořují zobák do vody a chytají ryby. Někteří pelikáni mají zobák ponořený po celou dobu lovu, jiní při lovu bijí křídly do vody, na řekách někdy vytvoří dvě paralelní řady, plují proti sobě a vzájemně si nahánějí ryby. Kořist okamžitě vcelku polykají.

Hnízdí koloniálně na skalnatých i plochých pobřežích a ostrovech, stromech a v rákosí. V sezení na vejcích se střídají oba rodičové zhruba po 24 hodinách. Pelikáni nemají hnízdni nažiny, v zahřívání vajec jim proto napomáhají široké plovací blány. Zahřívání začíná už po snesení prvního vejce, proto se mláďata líhnou postupně. Při nedostatku potravy je to výhoda, nejstarší, tím i nejsilnější mládě má lepší šanci na přežití, než kdyby byla všechna mláďata stejně stará. V úspěšné kolonii připadá 1 mládě na pár. Vylíhlá mláďata jsou krmena vyvrženou potravou a od stáří dvou týdnů zastrkují hlavu hluboko do zobáku rodičů, kteří jim nosí natrávené ryby. Pelikáni pohlavně dospívají od tří do pěti let. Jsou dlouhověcí, v přírodě se mohou dožít 15-25 let, v zajetí bylo dosaženo věku 54 let (Šťastný *et al.*, 1998).

Recentní zdroje uvádí osm zástupců této čeledi, vedených jako samostatný druh, viz níže. Pelikán menší (*Pelecanus roseus*) byl následnými studii zrušen jako druh i poddruh pelikána bílého (del Hoyo *et al.*, 1992).

Pelikán africký (*Pelecanus rufescens*)

Pelikán africký je rozšířen v subtropické a tropické Africe, dříve také na Madagaskaru a nyní i v jihozápadní Arábii. Většinou obývá prostředí sladkých vod, jezer, bažin, řek a dočasných jezer. Délka těla je až 132 cm, váží až 7 kg, zobák je dlouhý i 38 cm a v rozpětí křídel má až 290 cm. Má světle šedé peří, na zádech a spodní části těla je zbarven do růžova. Barva nohou může být šedá, žlutá nebo červenooranžová. Mláďata jsou podobná dospělci, shora jsou více hnědá a s růžovým zbarvením. Pelikán africký se vyskytuje v menších skupinkách nebo i jednotlivě. Na rozdíl od ostatních druhů nelví v organizovaných skupinách. Podle Světového svazu ochrany přírody (IUCN) je tento druh pelikána běžný a velmi hojný v subsaharské oblasti (Anonymous, 2010a; del Hoyo *et al.*, 1992).

Pelikán australský (*Pelecanus conspicillatus*)

Jediný pelikán žijící v Austrálii a Tasmánii. Obývá prostředí velkých jezer, řek a nejrůznějších mokřadů, včetně dočasných jezer v suchých oblastech. Délka těla je až 188 cm, váží až 6,8 kg, zobák je dlouhý i 50 cm u samce a 41 cm u samice. V rozpětí křídel má až 260 cm. Je celý bílý, jen křídla jsou shora černá a má žlutou kůži kolem očí. Pelikán australský je nezaměnitelný svou krátkou šedou chocholkou, zobákem s háčkem na konci a žlutým nebo růžovým krčním vakem. Nohy a prsty má modrošedé. Mláďata mají peří podobné dospělci, černou barvu však nahrazuje hnědá. Podle IUCN je tento druh pelikána běžný a globálně neohrožený (Anonymous, 2008; Anonymous, 2010b; del Hoyo *et al.*, 1992).

Pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*)

Pelikán bílý je rozšířen v jihovýchodní Evropě až Mongolsku, v Africe jižně od Sahary, v severozápadní Indii a jižním Vietnamu. Obývá jezera sladkých či brakických vod, delty (např. delta Dunaje s 2 500 páry tohoto druhu), laguny a močály. Samec má délku těla 175 cm, váží až 15 kg a zobák má dlouhý i 47 cm. Samice má délku těla 148 cm, váží až 9 kg a zobák má dlouhý i 40 cm. Pelikán bílý má v rozpětí křídel až 360 cm. Tento pelikán má lysou růžovou kůži kolem oka, šedobílé opeření a růžové

nohy. Dospělí ptáci mají ve svatebním šatu na hlavě chocholku. Mladí ptáci jsou šedí a mají tmavé letky. Podle IUCN je tento druh pelikána běžný, globálně neohrožený (Anonymous, 2008; Anonymous, 2010c; del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998).

Pelikán hnědý (*Pelecanus occidentalis*)

Pelikán hnědý obývá pobřeží a ostrovy Severní až Jižní Ameriky a karibské oblasti. Délka těla je až 152 cm, váží přes 3,5 kg a zobák má dlouhý i 35 cm. V rozpětí křídel má až 228 cm. Pelikán hnědý je převážně stříbřitě šedý a hnědý, hlava je bílá nebo bílo-žlutá a hřívá na zadní části krku kaštanová. Kůže na obličeji a hrdelní vak jsou nazelenalé, v hnízdní době je zbarvení sytější. Je to jediný opravdu mořský druh pelikána, který jako jediný loví ryby střemhlavým pádem do vody z výšky 10 m. Mláďata jsou zbarvena do zašlé hnědé a mají šedý zobák. Podle IUCN je tento druh pelikána běžný, globálně neohrožený, dokonce zřejmě nejpočetnější druh pelikána s 600 000 až jedním milionem hnízdicích ptáků jen v peruánských koloniích, kde se těží cenné guáno (Anonymous, 2008; Anonymous, 2010d; Burnie, 2002; del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998).

Pelikán kadeřavý (*Pelecanus crispus*)

Pelikán kadeřavý je rozšířen v jihovýchodní Evropě, jižní a jihozápadní Asii a v severovýchodní Africe. Obývá řeky, jezera, delty a ústí řek. Je to největší evropský pelikán s délkou těla až 180 cm, váží až 13 kg a zobák je dlouhý i 45 cm. V rozpětí křídel má až 345 cm. Přes svou velikost a hmotnost výborně létá a v době tahu se vznáší velmi vysoko na svých nápadně velkých a širokých křídlech. Zbarvení je stříbrobílé, bez růžového nádechu, černé má jen špičky křídel, nejlépe patrné v letu. Pod světle žlutým zobákem s oranžovou špičkou má oranžově červený vak. Ryby loví obvykle individuálně nebo jen ve skupinkách po 2-3 jedincích. Při lovu ryb byla zaznamenána pozoruhodná spolupráce s kormorány velkými, kteří vyhledávají pelikány kadeřavé, aby v jejich stínech pod vodou lépe zaznamenali kořist, zatímco pelikáni snadněji loví ryby vyplašené dole kormorány. Mláďata jsou shora bledě šedo-hnědá a ze spodu špinavě bílá. Podle IUCN je tento druh pelikána v Červeném seznamu zařazen mezi zranitelné druhy (Anonymous, 2010e; Burnie, 2002; del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998).

Pelikán severoamerický (*Pelecanus erythrorhynchos*)

Pelikán severoamerický je rozšířen na západě Severní Ameriky, ve střední Kalifornii, podél tichomořského pobřeží až do Guatemaly, ale i na březích Mexického zálivu. Obývá řeky, sladkovodní jezera, mělké laguny, pobřeží a ústí řek. Délka těla je až 178 cm, váží až 8,5 kg a zobák je dlouhý i 37 cm u samce a 32 cm u samice. V rozpětí křídel má až 299 cm. Horní čelist je plochá se silným hřebenem, zakončená tupým hákem. Ve svatebním šatu má pelikán severoamerický horní čelist na kýlu ozdobenou hrbolem. Jeho kolonie velmi trpí nepříznivým počasím, které může způsobit vysokou úmrtnost dospělých ptáků i mláďat. Hnízdění ve velkých koloniích je však bezpečnější, protože snižuje pravděpodobnost napadení predátory. Mláďata mají tmavě hnědou šíjí a letky, zobák a vak jsou šedé. Podle IUCN je tento druh pelikána běžný a globálně neohrožený (Anonymous, 2008; Anonymous, 2010f; del Hoyo *et al.*, 1992).

Pelikán skvrnozobý (*Pelecanus philippensis*)

Pelikán skvrnozobý byl kdysi rozšířen v jižní Asii, nyní se omezeně vyskytuje na Srí Lance, Kambodži, jihovýchodní Indii a také na Sumatře. Obývá močály, ústí řek, jezera, nádrže, zaplavená pole, velká jezera, brakické laguny, přílivové zátoky a pobřeží. Malý pelikán s délkou těla až 152 cm, váží až 5 kg a zobák je dlouhý i 36 cm. Nohy jsou obvykle tmavě hnědé, občas i šedé. Peří je hnědé či šedé, původně načernalé, většinou zašlého vzhledu. Nehnízdící jedinci mají peří zašlejšího vzhledu s méně nápadnou chocholkou na hlavě a světle žlutou obličejovou pokožkou. V období hnízdění má pelikán skvrnozobý šedé skvrny na růžovém zobáku. Mláďata jsou více hnědá a nohy mají šedé. Podle IUCN je tento druh pelikána zařazen v Červeném seznamu mezi téměř ohrožené druhy (Anonymous, 2010g; del Hoyo *et al.*, 1992).

Pelikán chilský (*Pelecanus thagus*)

Pelikán chilský byl do roku 2007 klasifikován jako poddruh plikána hnědého. Vyskytuje se v Chile a Peru, stěhovavě také v Ekvádoru. Obývá sladké vody. Početnost populací se značně mění v závislosti na proudu El Niño, po kterém stav populací v roce 1998 výrazně poklesl. Nyní je počet populací stabilní, možná dokonce stoupá. Podle IUCN je pelikán chilský zařazen v Červeném seznamu mezi téměř ohrožené druhy (Anonymous, 2010h; Šťastný *et al.*, 1998).

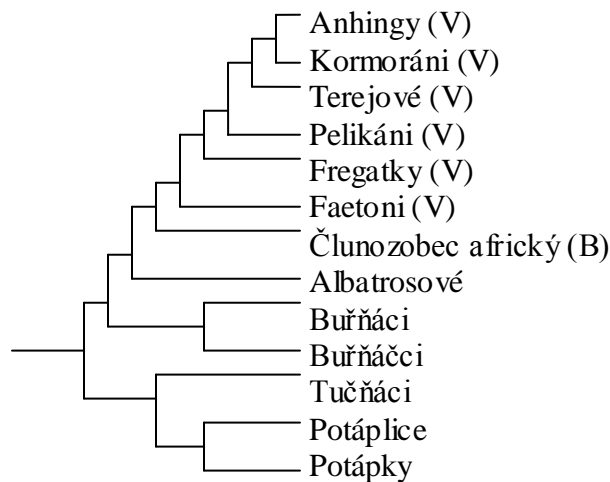
3.2 Molekulární vs. morfologické studie v řádu veslonohých

Donedávna byly morfologické charakteristiky hlavním a také jediným zdrojem organizace druhů do vyšších systematických kategorií pro konstrukci systematické klasifikace. Po zavedení metody DNA-DNA hybridizace se ovšem ukázaly i genetické znaky, které nemusí s touto „morfologickou“ klasifikací souhlasit. Fylogenetickou klasifikaci ptáků světa založenou na morfologických studiích popisuje např. Cracraft (1981).

Charakteristické znaky starobylého ptačího řádu veslonohých jsou čtyři prsty spojené plovací blánou. Palec směřující vpřed je spojený plovací blánou s druhým prstem, druhý se dále spojuje plovací blánou se třetím a třetí se čtvrtým. U ostatních vodních ptáků s plovacími blánami spojuje plovací blána pouze tři prsty, zatímco palec je volný či chybí. Tuto charakteristiku řádu splňuje přes šedesát žijících druhů, podle které jsou také zařazeni do zoologické nomenklatury. Patří sem pelikáni (*Pelecanus*), terejové (*Sula*, *Papasula*, *Morus*), kormoráni (*Phalacrocorax*), anhingy (*Anhinga*), fregatky (*Fregata*) a faetoni (*Phaethon*). Až na faetony mají všichni dále zřejmý jícnový vak, ovšem fregatky jej mají nadmutelný a používají ho pouze na okrasu. Mnoho ornitologů sdružilo tyto druhy do řádu, ačkoliv jsou faetoni více příbuzní k rybákům a fregatky více k buňákům a albatrosům (Hedges & Sibley, 1994). V evoluci se předpokládá, že plovací blána a jícnový vak vznikly pouze jednou, proto je z morfologického hlediska řád veslonohých monofyletický.

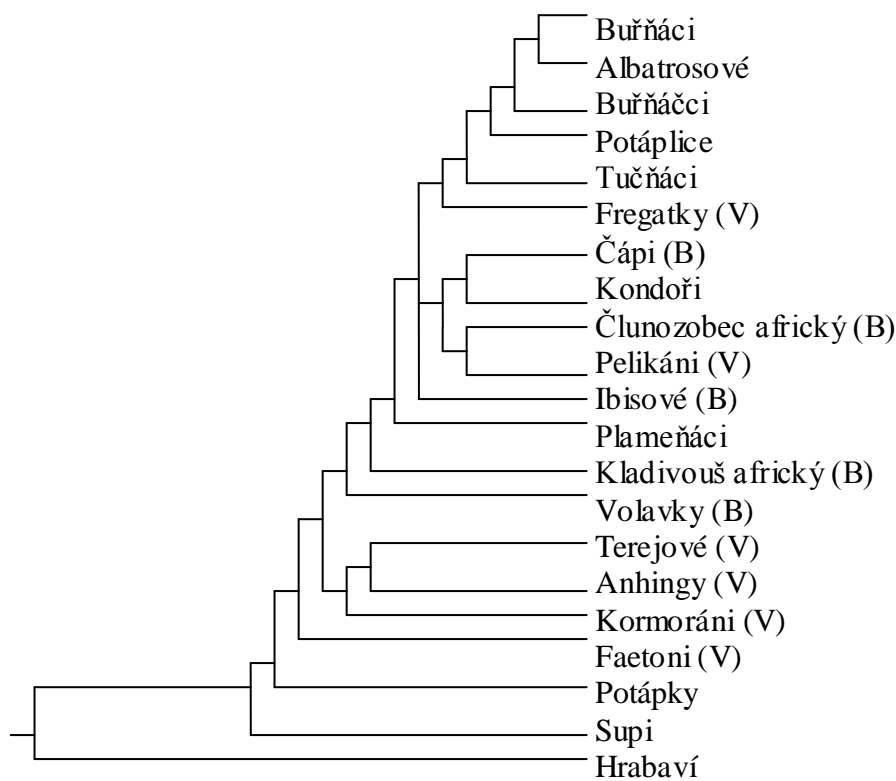
Od ostatních mořských či vodních řádů se odlišují umístěním žláz vylučujících sůl v očnici a chybějící hnízdní nažinou vyvinutou na abdomenu hnízdících ptáků, která je v přímém kontaktu s vejci během jejich inkubace a poskytuje přídatné teplo. Od sebe navzájem se liší v pánevním svalstvu, uspořádání krkavice a v několika dalších anatomických znacích, které dávají možnost polyfyletického původu. Existuje proto mnoho morfologických studií řádu veslonohých, podle kterých autoři dělí čeledi tohoto řádu do jiných řádů, subřádů a kde autoři potvrzují monofyletický původ řádu. Cracraft (1985) provedl fylogenetické analýzy k potvrzení monofilie řádu. Analyzoval 52 charakteristických znaků pomocí metody numerické kladistiky a potvrdil monofilii veslonohých dvanácti postulovanými synapomorfickými hypotézami (Obrázek č. 1) (Hedges & Sibley, 1994).

Obrázek č. 1: Fylogenetické vztahy řádu veslonohých sestavené podle 52 morfologických znaků. (V) = veslonoží, (B) = brodiví

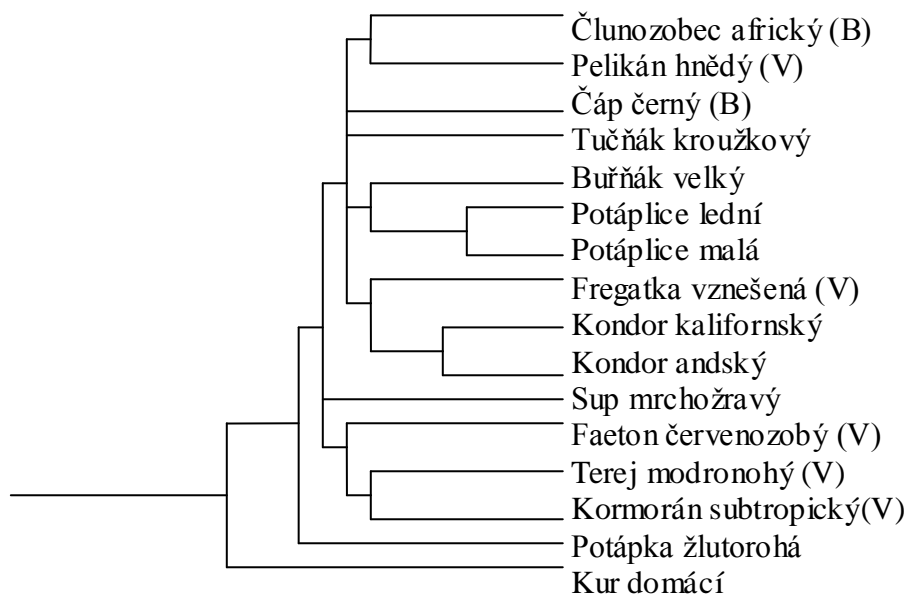


Sibley & Ahlquist (1990) srovnali genomy veslonohých a jiných hlavních skupin žijících ptáků technikou DNA-DNA hybridizace. Většina výsledků souhlasila s klasifikací založenou na morfologických znacích. Překvapivě ovšem zjistili, že pelikáni jsou geneticky víc příbuzní k člunozobci africkému (*Balaeniceps rex*); terejové, kormoráni a anhingy tvoří více příbuznou skupinu; faetoni nejsou příbuzní k žádnému jmenovanému taxonu; a že fregatky jsou nejbližší příbuzní tučňákům, potáplicím, buřňáčkům, buřňákům a albatrosům (*Procellarioidea*) (Obrázek č. 2). Člunozobec africký je z řádu brodivých (*Ciconiiformes*), čeledi člunozobcovití (*Balaenicipitidae*) a vyskytuje se ve střední Africe. Blízkou fylogenetickou příbuznost člunozobce s pelikány založenou na studiu DNA-DNA hybridizace potvrzují také např. Tuinen *et al.* (2001). Dle osteologických studií člunozobce, volavek, čápů a veslonohých se také usuzuje, že člunozobec může patřit do čeledi pelikánovitých (Cottam, 1957). Sibley & Ahlquist dále uvádějí sdělení J. M. Lowensteina, který pomocí radioimmunoassay srovnáním proteinů usoudil, že pelikáni nejsou blízce příbuzní k jinému taxonu s plovací blánou, což nikdy nepublikoval. Sibley & Ahlquist vyvodili, že noha pelikánů, chybějící hnízdní nažina, solné žlázy a jiné sdílené charakteristiky vznikly v evoluci více než jednou nebo byly ztraceny u předka řádu brodivých. Může to být považováno za alternativní hypotézu monofyletického původu veslonohých. Výsledky srovnání mezi DNA sekvencemi mitochondriální 12S rRNA a 16S rRNA u šestnácti taxonů (Obrázek č. 3) včetně veslonohých dokazují, že řád veslonohých je polyfyletický.

Obrázek č. 2: Fylogenetické vztahy řádu veslonohých sestavené podle výsledků DNA hybridizace. (V) = veslonozí, (B) = brodiví



Obrázek č. 3: Fylogenetické vztahy zástupců řádu veslonohých a dalších nepříbuzných ptáků odvozené podle DNA sekvencí mitochondriálních genů 12S rRNA a 16S rRNA. (V) = veslonozí, (B) = brodiví



Tyto sekvence byly získány z následujících 15 druhů ptáků: sup mrchožravý (*Neophron percnopterus*), potápka žlutorohá (*Podiceps auritus*), faeton červenozobý (*Phaethon aethereus*), terej modronohý (*Sula neboxii*), kormorán subtropický (*Phalacrocorax brasilianus*), čáp černý (*Ciconia nigra*), kondor kalifornský (*Gymnogyps californianus*), kondor andský (*Vultur gryphus*), fregatka vznešená (*Fregata magnificens*), člunozobec africký (*Balaeniceps rex*), pelikán hnědý (*Pelecanus occidentalis*), tučňák kroužkový (*Pygoscelis adeliae*), potáplice lední (*Gavia immer*), potáplice malá (*Gavia stellata*) a buňňák velký (*Puffinus gravis*). Pro srovnání byla přidána korespondující sekvence kura domácího (*Gallus gallus*). Výsledky se dále shodují v mnoha faktech získaných z DNA-DNA hybridizace, zvláště v příbuznosti pelikánů s člunozobcem africkým. Dá se tedy usuzovat, že pelikáni patří z morfologického hlediska do řádu veslonohých. Z molekulárního hlediska ovšem (DNA-DNA hybridizací) sdílejí výše uvedené druhy ptáků relativně nedávného společného předka, ačkoliv jejich morfologická odlišnost předpokládá větší fylogenetické rozdíly (Hedges & Sibley, 1994).

Informace z DNA sekvencí podporující dřívější výsledky z DNA-DNA hybridizace (Sibley & Ahlquist, 1990) ukazují, že noha veslonohých, jícnový vak a několik dalších morfologických znaků sloužících k rozpoznání tradičního řádu veslonohých, nejsou užitečné pro odvození fylogeneze. Spíše jsou pelikáni a fregatky více příbuzní ptákům s rozdílnou morfologií, jako člunozobec, kondoři, tučňáci, čápi, potáplice a buňňáci, viz Obrázek č. 3. Sibley *et al.* (1988), Sibley & Ahlquist (1990) a Sibley & Monroe (1990) proto vytvořili z dat DNA-DNA hybridizace novou klasifikaci, kde byly hlavní změny v řádu brodivých. Tento řád rozdělili na podřády Charadrii a Ciconii. Podřád Charadrii dělí na infrařády Pteroclidés a Charadriides. Pořád Ciconii autoři dále rozdělili na infrařády Falconides a Ciconiides. Do pozměněného řádu brodivých tedy nově zařadili tradiční řády veslonohých, potápek, potáplíc, tučňáků, trubkonosých, dlouhokřídlých a dravců. Nicméně systém založený na morfologii je používán v ornitologii víc než století a většina recentních prací podle něj také ptáky stále klasifikuje.

Byly navrženy různé přístupy k vyřešení konfliktů mezi molekulárními a morfologickými odhady fylogeneze. Do budoucna se předpokládá vznik analýzy, která by kombinovala všechna morfologická a molekulární data k sjednocení fylogeneze (Kluge, 1989).

3.3 Studium mikrosatelitových lokusů v řádu veslonohých

O *cross-species* testování mikrosatelitových lokusů u pelikánů byly doposud publikovány pouze dva články: Hickman *et al.* (2008) a de Ponte Machado *et al.* (2009). Oba autoři testovali *cross-species* amplifikaci mikrosatelitových lokusů odvozených z čeledi pelikánovitých (*Pelecanidae*) opět na druzích této čeledi. Hickman *et al.* (2008) popsali celkem devět mikrosatelitových lokusů PeEr 01 až PeEr 09 odvozených od pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), jejichž polymorfismus testovali na 23 jedincích dvou různých populací pelikána severoamerického. De Ponte Machado *et al.* (2009) popsali celkem deset mikrosatelitových lokusů PEL086 až PEL304 odvozených od pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), jejichž polymorfismus testovali na jednom jedinci pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), dvou jedincích pelikána severoamerického a pěti jedincích pelikána hnědého (*Pelecanus occidentalis*).

Cross-species amplifikací mikrosatelitové DNA se dále zabývala diplomová práce Ranochová (2008). Ve své práci testovala *cross-species* amplifikaci mikrosatelitových lokusů u pelikána afrického, bílého a kadeřavého (*Pelecanus crispus*) pomocí 62 párů primerů odvozených od taxonomicky příbuzných druhů ptáků - kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), volavky velké (*Ardea herodias*), potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*), nesyta lesního (*Mycteria americana*), ibise rudého (*Eudocimus ruber*) a kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*). V práci bylo z testovaných mikrosatelitových lokusů nalezeno u pelikána bílého 7 polymorfních, u pelikána afrického 4 polymorfní a u pelikána kadeřavého 2 polymorfní mikrosatelitové lokusy. Dále ve své práci testuje 35 párů primerů odvozených z řádu pěvců na pelikánu bílém, kde se ovšem polymorfní mikrosatelitové lokusy nenalezly.

Daší druh pelikána jsem testovala ve své bakalářské práci (Mikulová, 2008). Na pelikánu skvrnozobém (*Pelecanus philippensis*) jsem pomocí *cross-species* mikrosatelitové amplifikace otestovala 62 mikrosatelitových lokusů jako Ranochová (2008) a dalších 8 odvozených od kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*). V této bakalářské práci jsem našla 5 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

3.4 Studium vnitrodruhové příbuznosti u ptáků

Pro odlišení příbuznosti u ptáků se hledají molekulární markery v DNA, které by byly vhodné k určování příbuzenských vztahů, jako je např. paternita a maternita. Za tímto účelem se hledá u těchto markerů využitelný polymorfismus. Polymorfismus může být odhalen metodami, jako je např. polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP – *amplified fragment length polymorphism*), DNA fingerprinting, náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD – *randomly amplified polymorphic DNA*) nebo pomocí mikrosatelitové DNA.

3.4.1 Mikrosatelitová DNA

Mikrosatelitová DNA neboli mikrosatelity se nacházejí v prokaryotických i eukaryotických genomech (Scribner & Pearce, 2000) a jsou charakterizovány vysokým stupněm délkového polymorfismu (Zane *et al.*, 2002). Mikrosatelity jsou tvořeny tandemovými repeticemi, kde je délka opakujícího se motivu repetice 1 až 10 bp (Tautz, 1989; Weber, 1990). Nejčastější jsou dinukleotidové motivy, které se mění v rámci taxonů. U savců je nejfrekventovanějším dinukleotidovým mikrosatelitem thymín-guaninová repetice TG resp. AC (Zima *et al.*, 2004) v počtu kopií 10^5 (Hamada *et al.*, 1984). Pravděpodobnost jednoho mikrosatelitu u člověka je každých 6 kb DNA (Beckmann & Weber, 1992). Ptáci mají relativně méně mikrosatelitů než savci. U ptáků je jeden mikrosatelit každých 20 až 39 kb (Primmer *et al.*, 1997).

Mikrosatelity slouží především jako genetické markery. Hypervariabilita těchto markerů, velké množství mikrosatelitů a jejich typizace založená na PCR je dělá velmi vhodnými pro stanovení rodičovství a genetických vztahů mezi jedinci (Ellegren, 1992). Výhodou mikrosatelitů je také kodominantnost alel a možnost jejich přesné identifikace. Spojení s PCR také umožňuje analýzu mikrosatelitů i u vymřelých organismů. Problémem u mikrosatelitů je nalezení a identifikace vhodných primerů pro jejich amplifikaci (Zima *et al.*, 2004). Další nevýhodou v použití mikrosatelitů je nemožnost snadného použití markerů izolovaných z jednoho druhu na druhy příbuzné (Primmer *et al.*, 1996).

Mikrosatelitové lokusy jsou významným zdrojem genetické proměnlivosti (Tautz, 1989; Weber & May, 1989). Za hlavní zdroj vysoké proměnlivosti je považováno sklouznutí nukleotidového řetězce během replikace (*replication slippage*). Jednotlivé alely se proto navzájem liší svojí délkou, tj. proměnlivým počtem repetice, a mohou být separovány gelovou elektroforézou za předpokladu, že jsou známy sekvence primerů komplementární se sekvencemi obklopujícími daný mikrosatelitový lokus (Zima *et al.*, 2004).

3.4.2 *Cross-species* mikrosatelitová amplifikace

U druhů, kde nejsou mikrosatelitové lokusy známy, se hledají *de novo* nebo pomocí *cross-species* mikrosatelitové amplifikace. *Cross-species* mikrosatelitová amplifikace využívá PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů za použití primerů známých od jednoho druhu (zdrojový druh) k odhalení potenciálního polymorfismu mikrosatelitů na DNA u jiného druhu (cílový druh) (Ellegren, 1992). Poměr polymorfních mikrosatelitových lokusů mezi markery, které se amplifikují, se snižuje s rostoucí genetickou vzdáleností. *Cross-species* mikrosatelitová amplifikace je proto užitečným nástrojem pro určování fylogenetických vztahů a pro identifikaci druhů (Primmer *et al.*, 1996).

Omezením širší aplikace mikrosatelitů je nedostatek univerzálnosti PCR primerů úspěšně amplifikujících homologické produkty široké škály druhů. Dalším omezením je klesající PCR annealingová teplota, se kterou roste šance úspěšné *cross-species* amplifikace a pozitivní vztah mezi polymorfismem původního druhu a velikostí polymorfismu cílového druhu, u kterého byl polymorfní lokus odhalen. Nebyl ovšem pozorován vztah mezi *cross-species* amplifikací a délkou motivu repetice či strukturou repetice (Primmer *et al.*, 2005).

Pomocí genotypizace polymorfních mikrosatelitových lokusů se následně zjistí konstituce alel u všech testovaných jedinců, což pomáhá k zařazení ptáků v systematické nomenklatuře, k zkvalitnění chovu a poznání biologie u nás tak vzácných pelikánů.

3.4.3 Univerzální EST mikrosatelitové sekvence

Izolace a vývoj mikrosatelitů je složitá a časově i finančně náročná úloha, která zabere týdny či měsíce k jejímu dokončení. V minulém roce byly vyvinuty nové sety primerů s vysokou úspěšností *cross-species* amplifikace k identifikaci mikrosatelitových lokusů k analýzám rodičovství, populačním studiím či mapování genomu. Byl obnoven zájem o data EST mikrosatelitových sekvencí, užitečná pro analýzy populací u rozdílných taxonů (Ellis & Burke, 2007). Metoda byla demonstrována na ptácích kvůli jejich menšímu množství mikrosatelitových lokusů než v jiných taxonech (Primmer *et al.*, 1997).

Dawson *et al.* (2010) popisují jednoduchou metodu, kdy se zjistí Expressed Sequence Tag (EST) mikrosatelitové sekvence jednoho druhu s vysokým stupněm sekvenční homologie s jiným druhem a navrhnou se sety primerů, které ohraničují tato identická místa u obou druhů. Tyto nové mikrosatelitové markery jsou účinné v *cross-species* amplifikaci jako žádné předtím a jsou vhodné pro okruh aplikací, které vyžadují polymorfní ptačí markery k paternitním a populačním studiím. Metoda také usnadňuje mapování ptačího genomu, studie rekombinace a srovnání genetické variability mezi druhy bez zkreslení výsledku. Významně se také snižují náklady a čas na vývoj těchto nových lokusů. Metoda může být rychle použita k získání vysoce funkčních mikrosatelitových markerů u různých druhů (Dawson *et al.*, 2010).

K identifikaci nejvíce konzervovaných mikrosatelitových lokusů v ptačím genomu autoři srovnali homologní sekvence dvou druhů ptáků, zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura domácího (*Gallus gallus*). Zebřička z řádu pěvců a kur z řádu hrabavých jsou geneticky velmi vzdálené druhy, mající jednu z nejvyšších zaznamenaných genetických vzdáleností pro dva druhy ptáků založenou na DNA-DNA hybridizaci (Sibley & Ahlquist, 1990). EST mikrosatelitové sekvence od zebřičky pestré využili ze dvou důvodů: EST sekvence (kódující sekvence) jsou více konzervované a mají vyšší homologii s kurem domácím než ne-EST sekvence, a protože je znám velký počet EST mikrosatelitových sekvencí odvozených z DNA zebřičky (Slate *et al.*, 2007).

Dlouho se zkoumalo, které mikrosatelitové sekvence mohou být izolovány z EST sekvencí, bylo toho dosaženo z různých rostlinných a živočišných druhů, zahrnujících druhy s nízkým množstvím mikrosatelitů (Tang *et al.*, 2008). U ptáků byly zdroje EST sekvencí využity k získání mikrosatelitů pro hrabavé a pěvce (Karaiskou *et al.*, 2008). Mnoho EST sekvencí bylo identifikováno u ptáků zahrnujících různé druhy pěvců, např.

zebříčku pestrou (Replogle *et al.*, 2008). Tato data EST sekvencí mohou být využita pro mikrosatelity. Pokud jsou sety primerů navrženy jednoduše z EST mikrosatelitové sekvence, mají vyšší úspěšnost *cross-species* amplifikace a míru polymorfizmu než anonymní mikrosatelitové lokusy (Karaickou *et al.*, 2008). Jinými studiemi, např. u rostlin byla doložena omezená mezidruhová využitelnost EST mikrosatelitových lokusů, dokonce i když protokol obsahoval další algoritmy k vylepšení vývoje primeru (Pashley *et al.*, 2006).

K vývoji úspěšného setu primerů, které mají nejvyšší mezidruhovou využitelnost, musí být dostupné zdroje sekvencí daného taxonu. Zdroje pro ptáky zahrnují shromážděné genomy zebříčky pestré a kura domácího, dále data EST sekvencí izolovaných z těchto a jiných ptačích druhů a ptačích mikrosatelitových sekvencí izolovaných z genomických knihoven. Metoda umožňuje identifikaci konzervovaných mikrosatelitových lokusů, které jsou informativně polymorfnní napříč neobvykle širokým spektrem druhů, a které mohou být amplifikovány pomocí jediného standardního páru primerů, který poskytne amplifikaci těchto lokusů za standardních podmínek.

Nejdříve se identifikují mikrosatelitové lokusy, které přicházejí nejvíce v úvahu. Sekvence vykazující vysokou homologii mezi zdrojovými druhy a kurem byly použity k demonstraci rostoucího stupně amplifikace napříč jinými příbuznými druhy se zdrojovým (Küpper *et al.*, 2008). Autoři použili sekvenční homologii zebříčka pestrá – kur domácí k identifikaci nejvíce konzervativních mikrosatelitových lokusů pěvců. Poté vyvinuli sety primerů pro selektované lokusy, které byly identické ve složení párů bází u obou druhů. Pro maximální využití potenciálu *cross-species* amplifikace se nepoužívaly degenerované báze. Autoři dodatečně navrhli sety primerů pro tyto lokusy s velmi podobnou teplotou nasednutí primerů a tím demonstrovali, že mohou být amplifikovány současně na stejnou annealingovou teplotu a podmínky PCR. Použili 33 konzervovaných párů primerů, u kterých se amplifikovalo v průměru 100 % lokusů u každého ze 17 druhů pěvců a 99 % lokusů u pěti druhů ne-pěvců. Genotypizací čtyř jedinců na druh bylo průměrně 48 % lokusů polymorfnních u pěvců a průměrně 21 % u ne-pěvců. Pokud bylo genotypováno nejméně 17 jedinců na druh pro čtyři pěnkaovitě druhy, 71 až 85 % lokusů bylo polymorfnních, pozorovaná heterozygotnost byla kolem 0,50 pro většinu lokusů a žádný lokus se významně neodchýlil od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Dawson *et al.*, 2010).

4 Materiál a metody

4.1 Izolace genomické DNA pro PCR z krve ptáků

Z krve získané od jedinců z chovu pelikánů Zoologické zahrady ve Dvoře Králové nad Labem byla vyizolována genomická DNA pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), pelikána kadeřavého (*P. crispus*), pelikána bílého (*P. onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). Postup je převzatý podle Maniatis *et al.* (1982) a upravený pro materiální a technické podmínky laboratoře:

- 1) K 500 μ l roztoku krve v Queen's pufu (Seutin *et al.*, 1991) v mikrozkuhavce se přidá 100 μ l roztoku proteinázy K, 100 μ l roztoku SDS a nechá se inkubovat přes noc za překlápění v termostatu při 37 °C.
- 2) Ke směsi se přidá 300 μ l fenolu, 300 μ l chloroformu, směs se zvertexuje a zcentrifuguje. Ustříženou špičkou se odebere vrchní fáze.
- 3) Přidá se 700 μ l chloroformu, mikrozkuhavka se zvertexuje a zcentrifuguje. Odebere se vrchní fáze, přidá se 700 μ l chloroformu, mikrozkuhavka se opět zvertexuje a zcentrifuguje.
- 4) K odebranému roztoku se přidá 180 μ l vychlazeného octanu sodného a mikrozkuhavka se vyplní vychlazeným 96% ethanolem. Promíchá se překlápěním a uloží se na 2 hodiny do -20°C.
- 5) Mikrozkuhavka se zcentrifuguje, slijí se ethanol a obsah se vysuší v termobloku. K vysušené DNA se připipetuje 500 μ l TE pufu. Nechá se překlápět přes noc v termostatu při 40 °C.
- 6) Fluorometricky se stanoví koncentrace roztoku DNA v mikrozkuhavce a nechá se zamrazit v -20 °C.

4.2 Hledání vhodných mikrosatelitových markerů analýzou *cross-species* mikrosatelitové DNA

Na vyizolované DNA pelikána afrického, kadeřavého, bílého a skvrnozobého byly testovány *cross-species* mikrosatelitovou amplifikací primery amplifikující polymorfni mikrosatelitové lokusy odvozené z DNA ptáků (a jednoho druhu savce) uvedených

v Tabulce č. 1. Na vyizolované DNA pelikána bílého a skvrnozobého byly dále testovány *cross-species* mikrosatelitovou amplifikací primery amplifikující polymorfní mikrosatelitové lokusy odvozené z DNA ptáků uvedených v Tabulce č. 2.

Tabulka č. 1: Testované páry primerů použité pro *cross-species* amplifikaci mikrosatelitových lokusů u pelikána afrického, kadeřavého, bílého a skvrnozobého s uvedením zdrojových druhů, u kterých byly tyto primery polymorfní. Řád veslonozí – V, brodiví – B, sudokopytníci – S a plameňáci – P.

Zdrojový druh	Testované mikrosatelitové lokusy
kormorán galapážský * (<i>Phalacrocorax harrisi</i>) V	PhB2, PhB4, PhB11, PhC11, PhD11, PhF12, PhG8 a PhG12 (Duffie <i>et al.</i> , 2008)
ibis japonský (<i>Nipponia nippon</i>) B	NnAF4, NnBF7, NnCE11, NnCG3, NnDD9, NnEB12, NnHB12, NnNF5, NnEA9, NnAD10, NnEH10, NnGF4, NnLF11 (Ji <i>et al.</i> , 2004), Nn01, Nn03, Nn04, Nn12, Nn16, Nn17, Nn18, Nn21, Nn23, Nn25 a Nn26 (He <i>et al.</i> , 2006)
zebu indický (<i>Bos indicus</i>) S	HEL1 (Sodhi <i>et al.</i> , 2006)
plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>) P	Pru μ 1, Pru μ 2, Pru μ 3, Pru μ 4, Pru μ 5 a Pru μ 6 (Kapil, 2005; Kapil <i>et al.</i> , 2010)
pelikán severoamerický (<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>) V	PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 07, PeEr 08 a PeEr 09 (Hickman <i>et al.</i> , 2008)
pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>) V	PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265 a PEL304 (de Ponte Machado <i>et al.</i> , 2009)

* Mikrosatelitové lokusy testované na pelikánu skvrnozobém již v bakalářské práci Mikulová (2008).

Tabulka č. 2: Testované páry primerů použité pro *cross-species* amplifikaci mikrosatelitových lokusů u pelikána bílého a skvrnozobého s uvedením zdrojových druhů, u kterých byly tyto primery polymorfní. Řád veslonozí – V, brodiví – B, plameňáci – P, vrubozobí – R, tučňáci – T, dlouhokřídlí – D a potáplice O.

Zdrojový druh	Testované mikrosatelitové lokusy
kachna divoká * (<i>Anas platyrhynchos</i>) R	APH07, APH09 (Maak <i>et al.</i> , 2000), APH08, APH12, APH13 a APH16 (Maak <i>et al.</i> , 2003)
kajka mořská * (<i>Somateria mollissima</i>) R	Smo10 (Paulus & Tiedemann, 2003)
kachnice laločnatá * (<i>Biziura lobata</i>) R	Blm1, Blm10 a Blm12 (Guay & Mulder, 2005)
pížmovka velká * (<i>Cairina moschata</i>) R	CmAAT16, CmAAT35 a CmAAT38 (Stai & Hughes, 2003)
kolpík malý (<i>Platalea minor</i>) B	PM1-4, PM1-13, PM1-17, PM2-14, PM2-16, PM2-20, PM2-21, PM2-28, PM2-29, PM2-37, PM2-62, PM2-68, PM2-80, PM3-13, PM3-15, PM3-16, PM3-17, PM3-20, PM3-22, PM3-25, PM3-28, PM3-29 a PM3-31 (Yeung <i>et al.</i> , 2009)
tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>) T	AM13 (Roeder <i>et al.</i> , 2001)
čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>) B	Cc01, Cc02, Cc03, Cc04, Cc05, Cc06, Cc07 (Shephard <i>et al.</i> , 2009), CC1 a CC9 (prof. Segelbacher, osobní sdělení)
kvakoš noční (<i>Nycticorax nycticorax</i>) B	nycti14, nycti15, nycti22, nycti26, nycti35, nycti36, nycti41, nycti43, nycti62, nycti68 a nycti74 (Chang <i>et al.</i> , 2009)
terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>) V	BOOB-RM2-F07, BOOB-RM3-D07, BOOB-RM3-F11, BOOB-RM4-A08, BOOB-RM4-B03, BOOB-RM4-C03, BOOB-RM4-D07, BOOB-RM4-E03, BOOB-RM4-E10, BOOB-RM4-F11 a BOOB-RM4-G03 (Faircloth <i>et al.</i> , 2009)
plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>) P	Pruμ7 a Pruμ13 (Preston, 2005; Kapil <i>et al.</i> , 2010)
alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>) D	Apy06 a Apy07 (Dawson <i>et al.</i> , 2005)

Zdrojový druh	Testované mikrosatelitové lokusy
potáplice lední (<i>Gavia immer</i>) O	GimA12EPA, GimC5EPA, GimD12EPA, GimE11EPA, GimD9EPA, GimC11EPA a GimA9EPA (McMillan <i>et al.</i> , 2004)
fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>) V	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17 a Fmin18 (Dearborn <i>et al.</i> , 2008)
volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>) B	Ae01, Ae04, Ae05, Ae09, Ae13, Ae24, Ae25, Ae26, Ae27, Ae28, Ae30, Ae35, Ae36, Ae37, Ae38, Ae42, Ae44 a Ae47 (Huang <i>et al.</i> , 2009)
kormorán ušatý (<i>Phalacrocorax auritus</i>) V	COR 01, COR 03, COR 05, COR 06, COR 07, COR 12, COR 15, COR 17, COR 19, COR 20, COR 21, COR 22, COR 23, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 35, COR 38, COR 40, COR 41, COR 43, COR 45 a COR 47 (Fike <i>et al.</i> , 2009)

* Mikrosatelitové lokusy testované pouze na pelikánu bílém.

4.2.1 Podmínky PCR amplifikace DNA

Složení PCR mixu pro 6 vzorků (včetně počítaných ztrát při pipetování):

10x reakční pufr	6,7 µl
Roztok MgCl ₂ o koncentraci 25 mmol/l	4,0 µl
Roztok dNTPs, každý o koncentraci 20 mmol/l	0,7 µl
Primer F o koncentraci 10 µmol/l	3,3 µl
Primer R o koncentraci 10 µmol/l	3,3 µl
aTaq DNA polymeráza 5 U/µl	0,7 µl
Deionizovaná voda	44,7 µl

Mikrozkumavka se po napipetování všech složek zvertexuje a krátce zcentrifuguje. Každá reakce sestává z 9 µl PCR mixu a 1 µl roztoku DNA o koncentraci 50 µg/ml.

Časový a teplotní profil PCR reakce:

5 min: 94 °C

35 x: 30 s: 94 °C

30 s: teplota viz Tabulka č. 3 až 6.

30 s: 72 °C

7 min: 72 °C

4.2.2 Zpracování PCR produktů

Tento postup je optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra s rozměry skel 333 x 392 mm a 333 x 418 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

- 1) Větší omyté sklo se ošetří na ploše, která se bude dotýkat gelu, přípravkem na odpuzování vody. Kratší sklo se ošetří na ploše, která se bude dotýkat gelu, 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu s 3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu.
- 2) Větší sklo se umístí do digestoře ošetřenou plochou nahoru, na něj se po stranách položí spacers a na ně se položí menší sklo ošetřenou plochou dolů. V místě spacerů se skla na každé straně sepnou dvěma klipsy.
- 3) Připraví se 6% roztok polyakrylamidového gelu. Celý roztok se promíchá a ihned se nalévá mezi obě skla.
- 4) Do místa, kde se plnil prostor gelem, se vsune mezi skla hřebínek rovnou stranou asi 1 cm hluboko. V místě hřebínku se skla sepnou čtyřmi klipsy a gel se nechá hodinu polymerizovat. Poté se sundají klipsy, skla se omyjí od zbytků polyakrylamidu a sklo se upevní do elektroforetické komůrky.
- 5) Katodový i anodový prostor se zalije 0,5x TBE pufrem, vytáhne se hřebínek a vzniklá mezera mezi skly se dobře vyčistí proudem pufru z injekční stříkačky. Oba prostory se uzavřou, nasadí se elektrody a gel se nechá předeřhát asi na 48 °C (asi 30 minut) pomocí zdroje stejnosměrného elektrického proudu nastaveného na výkon 90 W.
- 6) PCR produkt se smísí s nanášecím pufrem a vloží se na 3 minuty do denaturačních podmínek (termocyclér na 96 °C). Pak se vzorky okamžitě vsunou do ledové tříště, aby se zabránilo renaturaci denaturované DNA.

- 7) Vypne se zdroj proudu, odpojí se katoda a otevře se katodový prostor, který se znovu vyčistí proudem pufru. Do této mezery mezi skly se vsune hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu.
- 8) Nyní se nanese po 2 μ l jednotlivých vzorků osmikanálovou pipetou. Po nanesení se katodový prostor opět uzavře, nasadí se elektroda a na zdroji se nastaví výkon 70 W.
- 9) Čas separace vzorků závisí na molekulárních hmotnostech (délkách) rozdělovaných PCR produktů. Orientačně se řídí pomocí barviv v nanášecím pufru. Obvyklá doba separace vzorků je 1,5 až 3 hodiny.
- 10) Po uplynutí času elektroforetického dělení vzorků se vypne zdroj proudu, odpojí se obě elektrody, vypustí se pufr z katodové části, povolí se šrouby úchytů skel a gel se položí kratším sklem nahoru. Vytáhne se hřebínek i oba spacers a skla se odpáčí od sebe.
- 11) Kratší sklo s přilepeným gelem se otočí gelem nahoru, uloží se do fotomisky, umístí se na třepačku a zalije fix/stop roztokem na 20 minut.
- 12) Fix/stop se slije zpět do baňky a sklo s gelem se 3 krát promyje deionizovanou vodou. Následuje 5 minutové promytí gelu v 1% roztoku HNO_3 , vylití tohoto roztoku a promytí gelu 4 krát deionizovanou vodou.
- 13) Sklo s gelem se umístí na třepačku do 0,1% roztoku AgNO_3 . Roztok se nechá působit přibližně 30 minut. Ke konci této doby se připraví jedna fotomiska s 2 l deionizované vody a druhá fotomiska s vývojkou.
- 14) Roztok AgNO_3 se slije zpět do zásobní lahve. Sklo s gelem se vyjme a ponoří na 5 vteřin do misky s deionizovanou vodou. Sklo se vyjme, nechá se okapat a přemístí se do fotomisky s vývojkou na třepačce, kde se sleduje vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů.
- 15) Když jsou proužky dostatečně zřetelné, vyvíjení se zastaví přilítím fix/stop roztoku. Doba působení se odhaduje podle unikajících bublinek CO_2 .
- 16) Sklo s gelem se ponoří do deionizované vody a pak se přenesse na 1 hodinu do sušárny, kde se gel při 60 °C vysuší. Takto připravené sklo s gelem se vyhodnotí na negatoskopu a naskenuje se.

4.2.3 Použité chemikálie

Akrylamid (Serva)

aTaq DNA polymeráza (5U/μl), M1241 (Promega)

Bromfenolová modř (Serva)

Deionizovaná voda

Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400 μl každého – dATP, dCTP, dGTP, dTTP), U1240 (Promega)

Dusičnan stříbrný (Lachema)

Ethanol – 96% roztok (Seliko Olomouc)

Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachema)

Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Lachema)

Fenol (pH: 7,9 ± 0,2) (Sigma)

Formaldehyd (Lachema)

Formamid (Lachema)

Hoechst, No. 33258 trihydrochlorid (Sigma)

Hydroxid sodný (Lachema)

Chlorid sodný (Lachema)

Chloroform (Lachema)

Kyselina boritá (Lachema)

Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)

Kyselina chlorovodíková – 35% roztok (Lachema)

Kyselina octová – ledová (Lachema)

Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)

3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

Močovina (Lachema)

N-lauroylsarkosin (Sigma)

N,N'-methylenbisakrylamid (Serva)

N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)

Octan sodný – trihydrát (Lachema)

Peroxodisíran amonný (Serva)

Proteináza K (Sigma)

Rain-X – přípravek odpuzující vodu ze skel automobilů (Pennzoil-Quaker State)

Thiosíran sodný (Lachema)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)

Uhličitan sodný (Lachema)

Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.2.4 Použité roztoky

Akrylamid – 6% zásobní roztok:

420 g močoviny

484 ml deionizované vody

50 ml 10x TBE

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

po rozpuštění všech složek zfiltrvat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

Dusičnan stříbrný AgNO_3 – 0,1% roztok:

0,8 g AgNO_3

objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml

před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Fenol (pH: $7,9 \pm 0,2$):

100 ml fenolu (Sigma P-4557), pH $6,7 \pm 0,2$

6,5 ml ekvilibračního pufru, pH 10,5 (Sigma B-5658) (Tris 0,01 mol/l; pH 8,0;

EDTA 0,001 mol/l)

protřepat

před použitím nechat 2-4 hodiny stát a uchovávat při 4 °C

Fix/stop roztok:

800 ml deionizované vody

88 ml ledové kyseliny octové

Hydroxid sodný NaOH (1 mol/l) – roztok:

40 g hydroxidu sodného

doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Kyselina dusičná HNO_3 – 1% roztok:

800 ml deionizované vody

12 ml 65% HNO_3

Laurylsíran sodný (SDS) – 10% roztok:

100 g laurylsíranu sodného

rozpustit v 900 ml deionizované vody

pH upravit na 7,2 pomocí 35% kyseliny chlorovodíkové HCl (50 μl)

doplnit deionizovanou vodou do 1 l

3-methakryloxypropyltrimethoxysilan – roztok:

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

3 μl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

0,125 g bromfenolové modře

0,125 g xylenové modře

25 ml deionizované vody

100 ml formamidu

Octan sodný CH_3COONa (3 mol/l) – roztok:

408,24 g trihydrátu octanu sodného

rozpustit v 800 ml deionizované vody

pH upravit na 5,2 pomocí ledové kyseliny octové

doplnit deionizovanou vodou do 1 l

Peroxodisíran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ – 10% roztok:

1 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ rozpustit v 10 ml deionizované vody

uchovávat v mikrozkuvkách po 400 μl v -20°C

Polyakrylamidový 6% gel:

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

40 μl N, N, N', N'- tetramethylethylendiaminu

400 μl 10% roztoku peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

Pufr pro fluorometrické stanovení koncentrace roztoku DNA (pro 20 měření):

- 36 ml deionizované vody
- 4 ml 10x TNE pufru
- 4 μ l roztoku Hoechst No. 33258

Queen's pufr:

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,8
- 2 ml zásobního roztoku NaCl (5 mol/l)
- 2,92 g ethylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA)
- 10 g N-lauroylsarkosinu
- rozpustit v 900 ml deionizované vody
- pH upravit na 7,5 a doplnit deionizovanou vodou na 1 l

TBE pufr – 10x zásobní roztok:

- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 55 g kyseliny borité H_3BO_3
- 40 ml roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

TE pufr:

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 200 μ l zásobního roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustit v 800 ml deionizované vody
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l a zfiltrvat

TNE pufr – 10x zásobní roztok:

- 12,11 g Tris
- 3,72 g Na_2EDTA
- 116,89 g NaCl
- rozpustit v 800 ml deionizované vody
- upravit pH na 7,4
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l, zfiltrvat a uložit při 4 °C

Vývojka:

800 ml deionizované vody

24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3

umístit do chladničky, aby se vychladila na teplotu nižší než $10\text{ }^\circ\text{C}$

před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a $160\text{ }\mu\text{l}$ 1% roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

4.2.5 Použité laboratorní přístroje

Centrifuga Biofuge Pico (Heraeus)

Centrifuga MR22i (Jouan)

Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)

Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)

Fluorometr Hoefer DyNa Quant 200 (Amersham Biosciences)

Hybridizační pec Hybridiser HB-2D (Techne)

Laboratorní váhy EK-200g (AND)

Magnetická míchačka RCTbasic (Ika)

Mikropipety Finnpiette 0,5 až $10\text{ }\mu\text{l}$ (osmikanálová) a $0,3\text{ }\mu\text{l}$ až 1 ml (Labsystems)

Mikropipety Nichipipet EX $0,5\text{ }\mu\text{l}$ až 1 ml (Nichiryo)

Minicentrifuga E-contrifuge (Wealtec)

Negatoskop NEGA1 (Maneko)

Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)

Skener EPSON GT-15000

Sušárna HS 122S (Chirana)

Temperovaný blok Dri-block DB-2D (Techne)

Termocyklér XP Thermal Cycler (BIOER technology)

Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)

Vortex MS2 (Ika)

Výrobník deionizované a ultračisté vody (AquaOsmotic)

Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5 Výsledky

6 Diskuze

7 Závěr

Ve své práci jsem otestovala pomocí *cross-species* mikrosatelové amplifikace u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), pelikána kadeřavého (*P. crispus*), pelikána bílého (*P. onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*) mikrosatelitové lokusy, odvozené z DNA ptáků řádů veslonohých, brodivých a plameňáků. Pro zajímavost jsem u těchto druhů otestovala mikrosatelitový lokus odvozený z DNA savce řádu sudokopytníků. U pelikána bílého a skvrnozobého jsem dále otestovala mikrosatelitové lokusy odvozené z DNA řádů tučňáků, dlouhokřídých a potáplic. U pelikána bílého jsem navíc otestovala několik párů primerů odvozených z DNA řádu vrubozobých.

U pelikána afrického a kadeřavého jsem našla devět polymorfních mikrosatelitových lokusů. U pelikána bílého jsem našla 39 polymorfních mikrosatelitových lokusů a u dalších 10 mikrosatelitových lokusů, odvozených od pelikána bílého, jsem ověřila polymorfizmus. Tyto polymorfní mikrosatelitové lokusy nalezené u pelikána afrického, kadeřavého a bílého navrhuji pro další paternitní studium.

U pelikána skvrnozobého jsem našla celkem 31 polymorfních mikrosatelitových lokusů, vč. své bakalářské práce (Mikulová, 2008). Na základě genotypizační analýzy těchto polymorfních mikrosatelitových lokusů byly zjištěny počty alel u šesti nepříbuzných jedinců a byla ověřena paternita šesti dospělců (rodičů) a jejich 11 mláďat. Původně polymorfní mikrosatelitový lokus PcT 1 z bakalářské práce Mikulová (2008) byl po genotypizační analýze vyhodnocen jako monomorfní. U 17 jedinců pelikána skvrnozobého jsem vypočítala charakteristiky pro všechny polymorfní mikrosatelitové lokusy.

Dané polymorfní mikrosatelitové lokusy, s výjimkou lokusů nesoucích nulové alely s frekvencí výskytu nulových alel 10 % a více, navrhuji použít k paternitním analýzám. Tyto analýzy mohou zkvalitnit chov pelikánů v zajetí a předejít křížení příbuzných jedinců. Zároveň znalost variability populací těchto ptáků může pomoci jejich ochraně v rámci přirozených oblastí výskytu.

8 Seznam zkratek

bp	pár bází (<i>base pair</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
EMBL	European Molecular Biology Laboratory (http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html)
EST	Expressed Sequence Tag
H _{Exp}	očekávaná heterozygotnost (<i>expected heterozygosity</i>)
H _{Obs}	pozorovaná heterozygotnost (<i>observed heterozygosity</i>)
HW	Hardy-Weinbergův zákon
IUCN	The International Union for Conservation of Nature (http://www.iucn.org)
PAA gel	polyakrylamidový gel
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIC	polymorphic information content
SDS	laurylsíran sodný (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SNPs	single nucleotide polymorphisms
T _a	teplota annealingu (<i>annealing temperature</i>)
Tris	trishydroxymethylaminomethan

9 Použitá literatura

- Anonymous (2008): Ptáci – Obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha.
- Anonymous (2010a): BirdLife International 2009. *Pelecanus rufescens*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. <http://www.iucnredlist.org>. Staženo 20. dubna 2010.
- Anonymous (2010b): BirdLife International 2009. *Pelecanus conspicillatus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. <http://www.iucnredlist.org>. Staženo 20. dubna 2010.
- Anonymous (2010c): BirdLife International 2009. *Pelecanus onocrotalus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. <http://www.iucnredlist.org>. Staženo 20. dubna 2010.
- Anonymous (2010d): BirdLife International 2009. *Pelecanus occidentalis*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. <http://www.iucnredlist.org>. Staženo 20. dubna 2010.
- Anonymous (2010e): BirdLife International 2008. *Pelecanus crispus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. <http://www.iucnredlist.org>. Staženo 20. dubna 2010.
- Anonymous (2010f): BirdLife International 2009. *Pelecanus erythrorhynchos*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. <http://www.iucnredlist.org>. Staženo 20. dubna 2010.
- Anonymous (2010g): BirdLife International 2008. *Pelecanus philippensis*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. <http://www.iucnredlist.org>. Staženo 20. dubna 2010.
- Anonymous (2010h): BirdLife International 2008. *Pelecanus thagus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. <http://www.iucnredlist.org>. Staženo 20. dubna 2010.
- Beckmann, J.S. & Weber, J.L. (1992): Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* (12), 627-631.
- Burnie, D. (2002): Zvíře – Obrazová encyklopedie živočichů všech kontinentů. Knižní klub, Praha.
- Cottam, P.A. (1957): *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology* (5), 49-72.
- Cracraft, J. (1981): Toward a phylogenetic classification of the recent birds of the world (Class Aves). *The Auk* (98), 681-714.
- Cracraft, J. (1985): Monophyly and phylogenetic relationships of the pelecaniformes: a numerical cladistic analysis. *The Auk* (102), 834-853.
- Dawson, D.A., Hunter, F.M., Pandhal, J., Buckland, R., Parham, A., Jones, I.L., Bradshaw, M., Jehle, R. & Burke, T. (2005): Assessment of 17 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5-15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes* (5), 289-297.
- 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.

- de Ponte Machado, M., Feldheim, K.A., Sellas, A.B. & Bowie, R.C.K. (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics* (10), 1033-1036.
- Dearborn, D.C., Hailer, F. & Fleischer, R.C. (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* (8), 1399-1401.
- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. (1992): *Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Ducks.* Lynx Editions, Barcelona.
- Duffie, C., Glenn, T.C., Hagen, C. & Parker, P. (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources* (8), 625-627.
- Ellegren, H. (1992): Polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of microsatellites—a new approach to studies of genetic relationships in birds. *The Auk* (109), 886-895.
- Ellis, J.R. & Burke, J.M. (2007): EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity* (99), 125-132.
- Faircloth, B.C., Ramos, A., Drummond, H. & Gowaty, P.A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *Conservation Genetics Resources* (1), 159-162.
- Fike, J.A., Devault, T.L. & Rhodes, O.E. (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* (9), 1183-1185.
- Geraci, J., Gaillard, M., Bechet, A., Cezilly, F. & Wattier, R.A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*. Preprint.
- Guay, P.-J. & Mulder, R.A. (2005): Isolation and characterization of microsatellite markers in musk duck (*Biziura lobata*: Aves) and their application to other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* (5), 249-252.
- He, L.-P., Wan, Q.-H., Fang, S.-G. & Xi, Y.-M. (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia Nippon*. *Conservation Genetics* (7), 157-160.
- Hedges, S.B. & Sibley, Ch. G. (1994): Molecules vs. Morphology in avian evolution: The case of the „pelecaniform“ birds. *Evolution* (91), 9861-9865.
- Hickman, C.R., Peters, M.B., Crawford, N.G., Hagen, C., Glenn, C. & Somers, C.M. (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* (8), 1439-1441.
- Huang, X., Zhou, X., Chen, M., Frang, W. & Chen, X. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics*. In press.
- Chang, Q., Xie, Z., Li, Q. & Zhou, K. (2009): Microsatellite loci developed for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservation Genetics* (10), 1537-1539.
- Ji, Y.-J., Liu, Y.-D., Ding, Ch.-Q. & Zhang, D.-X. (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* (4), 615-617.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. (2007): Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* (16), 1099-1106.

- Kapil, R. (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations. Doctoral Thesis. University of North Texas. Published online (www.unt.edu).
- Kapil, R., Sawyer, G.M., Preston, L., Benjamin, R.C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). Molecular Ecology Resources. Preprint.
- Karaiskou, N., Buggiotti, L., Leder, E. & Primmer, C.R. (2008): High degree of transferability of 86 newly developed zebra finch EST-linked microsatellite markers in 8 birds species. Journal of Heredity (99), 688-693.
- Kluge, A.G. (1989): A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). Systematic Zoology (38), 7-25.
- Küpper, C. Burke, T., Székely, T. & Dawson, D.A. (2008): Enhanced cross-species utility of conserved microsatellite markers in shorebirds. BMC Genomics (9), 502.
- Lei, Ch.-Z., Fan, G.-L., Zhang, Y.-D., Qiu, R.-B. & Chen, H. (2005): Genetic polymorphism in a cultured population of the crested ibis *Nipponia nippon*. Acta Zoologica Sinica (51), 650-656.
- Maak, S., Neumann, K., von Lengerken, G. & Gattermann, R. (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). Animal Genetics (31), 233.
- Maak, S., Wimmers, K., Weigend, S. & Neumann, K. (2003): Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. Molecular Ecology Notes (3), 224-227.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- McMillan, A.M., Bagley, M.J. & Evers, D.C. (2004): Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). Molecular Ecology Notes (4), 297-299.
- Mercer, D.M., Haig, S.M. & Mullins, T.D. (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). Conservation Genetics Resources. In press.
- Morris-Pocock, J.A., Taylor, S.A., Sun, Z. & Friesen, V.L. (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). Molecular Ecology Resources. Preprint.
- Mikulová, V. (2008): Studium paternity u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Pashley, C.H., Ellis, J.R., Mccauley, D.E. & Burke, J.M. (2006): EST databases as a source for molecular markers: lessons from *Helianthus*. Journal of Heredity (97), 381-388.
- Paulus, K.B. & Tiedemann, R. (2003): Ten polymorphic autosomal microsatellite loci for the Eider duck *Somateria mollissima* and their cross-species applicability among waterfowl species (Anatidae). Molecular Ecology Notes (3), 250-252.
- Preston, E.L. (2005): Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Ph.D. dissertation, University of North Texas, USA.
- 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., Moller, 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.
- Ranochová, A. (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Replogle, K., Arnold, A.P., Ball, G.F., Band, M., Bensch, S., Brenowitz, E.A., Dong, S., Denevich, J., Ferris, M., George, J.M., Gong, G., Hasselquist, D., Hernandez, A.G., Kim, R., Lewin, H.A., Liu, L., Lovell, P.V., Mello, C.V., Naurin, S., Rodriguez-Zas, S., Thimmapuram, J., Wade, J. & Clayton, D.F. (2008): The Songbird Neurogenomics (SoNG) Initiative: Community-based tools and strategies for study of brain gene function and evolution. *BMC Genomics* (9), 131.
- Roeder, A.D., Marshall, R.K., Mitchelson, A.J., Visagathilagar, T., Ritchie, P.A., Love, D.R., Pakai, T.J., McPartlan, H.C., Murray, N.D., Robinson, N.A., Kerry, K.R. & Lambert, D.M. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology* (10), 1645-1656.
- Scribner, K.T. & Pearce, J.M. (2000): Microsatellites: Evolutionary and Methodological Background and Empirical Applications at Individual, Population and Phylogenetic Levels. In: Baker, A.J. (Ed.): *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Seutin, G., White, B.N. & Boag, P.T. (1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* (69), 82-90.
- Sibley, C.G., Ahlquist, J.E. & Monroe, B.L., Jr. (1988): A classification of the living birds of the world based on DNA-DNA hybridization studies. *The Auk* (105), 409-423.
- Sibley, C.G. & Ahlquist, J.E. (1990): *Phylogeny and classification of birds: A study in molecular evolution*. Yale University Press, New Haven.
- Sibley, C.G. & Monroe, B.L. (1990): *Distribution and Taxonomy of Birds of the World*. Yale University Press, New Haven.
- Slate, J., Hale, M.C. & Birkhead, T.R. (2007): Simple sequence repeats in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) expressed sequence tags: a new resource for evolutionary genetic studies of passerines. *BMC Genomics* (8), 52.
- Sodhi, M., Mukesh, M., Prakash, B., Ahlawat, S.P.S. & Sobti, R.C. (2006): Microsatellite DNA typing for assessment of genetic variability in Tharparkar breed of Indian zebu (*Bos indicus*) cattle, a major breed of Rajasthan. *Journal of Genetics* (85), 165-170.
- Shephard, J.M., Galbusera, P., Hellemans, B., Jusic, A. & Akhandaf, Y. (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics* (10), 1525-1528.
- Stai, S.M. & Hughes, C.R. (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics* (34), 387-389.
- Šťastný, K., Bejček, V. & Hudec, K. (1998): *Svět zvířat IV. Ptáci* (1). Albatros Praha.
- Tang, J.F., Baldwin, S.J. & Jacobs, J.M.E., van der Linden, C.G., Voorrips, R.E., Leunissen, J.A.M., van Eck, H. & Vosman, B. (2008): Large-scale identification of polymorphic microsatellites using an in silico approach. *BMC Bioinformatics* (9), 374.

- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research* (17), 6463-6471.
- Taylor, S.A., Morris-Pocock, J.A., Sun, Z. & Friesen, V.L. (2009): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* (151), 525-528.
- van Tuinen, M., Butvill, D.B., Kirsch, J.A.W. & Hedges, S.B. (2001): Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* (268), 1345-1350.
- Weber, J.L. & May, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* (44), 388-396.
- Weber, J.L. (1990): Informativeness of (dC-dA)_n . (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* (7), 524-530.
- Wilson, R (2008): Sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) – Modern samples. Summer studentship 2007/2008. Published online (awcmee.massey.ac.nz).
- Yeung, C.K.L., Hsu, Y.-C., Yao, C.-T. & Li, S.-H. (2009): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics* (10), 1081-1084.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Paternello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* (11), 1-16.
- Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P. & Piálek, J. (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.