

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Nikola Juračková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu
brodiví u nesyta bílého (*Mycteria cinerea*)**

Bakalářská práce

Nikola Juračková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. a s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost a za cenné rady a připomínky, které mi poskytl při psaní této bakalářské práce. Chtěla bych také poděkovat ZOO Zlín-Lešná za poskytnutý biologický materiál.

Souhrn

Náplní této bakalářské práce byla *cross-species* PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitových lokusů.

V rámci teoretické části jsem se zabývala popisem řádu brodiví (Ciconiiformes) a jeho jednotlivých pěti čeledí. Především jsem se věnovala čeledi čápoovití (Ciconidae), do které nesyt bílý patří. V další kapitole jsem popisovala repetitivní sekvence s důrazem na mikrosatelity, jejich strukturu, variabilitu a využití. V poslední řadě jsem se věnovala způsobům hledání nových mikrosatelitových lokusů a taktéž popisu všech dosud nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů u ptáků z řádů brodiví, potáplice a potápky.

V experimentální části jsem metodou *cross-species* PCR amplifikace testovala 229 párů primerů na nesytu bílém, které představují všechny dosud navržené primery pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů u druhů z řádů brodiví, potáplice a potápky. Testovala jsem také několik vybraných párů primerů odvozených od ptáků z řádu vrubozobí, které byly již dříve úspěšně mezidruhově amplifikovány v rámci tohoto řádu. Amplifikaci a polymorfismus těchto primerů jsem testovala na DNA pěti jedinců nesyta bílého pocházejících ze ZOO Zlín-Lešná.

Ve výsledku jsem získala 26 polymorfních mikrosatelitových lokusů a z toho 25 lokusů bylo odvozeno od druhů z řádu brodiví a jeden lokus byl od zástupce řádu potápky. V rámci PCR byla optimalizována teplota *annealingu* a také délka elektroforetické separace polymorfních lokusů. Počet alel se pohyboval v rozmezí od 2 do 5.

Summary

The aim of this bachelor thesis was cross-species PCR amplification of polymorphic microsatellite loci.

The theoretical part deals with a description of the order Ciconiiformes and each of its five families. Mainly I was concentrated on the family Ciconiidae, where Milky Stork belongs. In the next chapter I described the repetitive sequences with an emphasis on the microsatellite - their structure, variability and use. Finally, I pursued the new ways for finding new microsatellites and I pursued also the description of all previously found polymorphic microsatellite loci in orders Ciconiiformes, Gaviiformes and Podicipediformes.

In the experimental part I tested 229 pairs of primers on Milky Stork's DNA by the method cross-species PCR amplification. These pairs of primers represented all previously designed primers for amplification of microsatellite loci in orders Ciconiiformes, Gaviiformes and Podicipediformes. I also tested several selected pairs of primers derived from the order Anseriformes - the primers were previously successfully amplified interspecific under this order. The amplification and polymorphism of the primers were tested on the DNA of five individuals of Milky Stork coming from ZOO Zlín-Lešná.

As a result, I gained 26 polymorphic microsatellite loci, 25 loci of them were derived from species of order Ciconiiformes and one locus was from order Podicipediformes. The annealing temperature for PCR and electrophoresis separation of polymorphic loci was optimized. The number of alleles ranged from 2 to 5.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíle práce	8
3	Literární přehled.....	9
3.1	Řád brodiví.....	9
3.1.1	Volavkovití.....	11
3.1.2	Člunozobcovití	11
3.1.3	Kladivoušovití	12
3.1.4	Ibisovití	12
3.1.5	Čápovití.....	12
3.1.5.1	Nesyt bílý	14
3.2	Repetitivní DNA	16
3.2.1	Rozptýlená repetitivní DNA	17
3.2.2	Tandemově uspořádaná repetitivní DNA.....	17
3.2.2.1	Satelity	18
3.2.2.2	Minisatelity	18
3.2.2.3	Mikrosatelity	19
3.3	Hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů.....	20
3.3.1	Mikrosatelity u ptáků řádu brodiví.....	22
3.3.2	Mikrosatelity u ptáků řádu potápky	30
3.3.3	Mikrosatelity u ptáků řádu potáplice.....	31
4	Materiál a metody	32
4.1	Biologický materiál.....	32
4.2	PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů.....	32
4.3	Zpracování PCR produktů.....	36
4.4	Použité chemikálie	39
4.5	Použité roztoky	40
4.6	Přístrojové vybavení	42
5	Výsledky	44
6	Diskuze	50
7	Závěr	59
8	Seznam zkratk	60
9	Použitá literatura	61

1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké sekvence DNA složené z opakujících se motivů dlouhých zpravidla do 10 párů bází. Vyskytují se v prokaryotickém i v eukaryotickém genomu a tvoří součást kódující i nekódující genetické informace. Mikrosatelity vykazují vysokou mutační rychlost, která ovlivňuje jejich variabilitu. A právě variabilita, spolu s relativně snadným získáváním mikrosatelitů, je předmětem genetických studií. Mikrosatelity jsou využívány jako genetické markery, které se uplatňují v populačních studiích, při studiu fylogenetické příbuznosti a určování paternity. Polymorfní mikrosatelity lze získat dvěma způsoby. Prvním je izolace mikrosatelitů *de novo* s využitím genomických knihoven a druhým je *cross-species* PCR amplifikace s použitím primerů navržených pro jiné (příbuzné) druhy.

Ve své bakalářské práci se věnuji hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů u pěti jedinců nesyta bílého (*Mycteria cinerea*). Pro tento ohrožený druh dosud nebyly nalezeny polymorfní mikrosatelitové lokusy, ke kterým by byly získány specifické páry primerů. Pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace bude testováno 229 párů primerů, které byly primárně navrženy pro amplifikaci 191 lokusů od brodivých, 18 lokusů od potápek, 7 lokusů od potáplic a vybraných 13 lokusů od vrubozobých.

2 Cíle práce

1. Shromáždit dostupné literární zdroje.
2. Vypracovat literární rešerši na dané téma.
3. Otestovat polymorfismus všech dosud publikovaných mikrosatelitů odvozených z řádu brodiví, potáplice, potápky a některých mikrosatelitů navržených pro druhy z řádů vrubozobí na 5 jedincích nesyta bílého (*Mycteria cinerea*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace.
4. U zjištěných polymorfních mikrosatelitů zoptimalizovat teplotu *annealingu* a délku elektroforetické separace PCR produktů v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek, aby byly co nejlépe hodnotitelné.

3 Literární přehled

3.1 Řád brodiví

Řád brodiví (Ciconiiformes) zahrnuje vesměs velké ptáky, s dlouhýma nohama, výrazným dlouhým zobákem a protáhlým, štíhlým, velmi ohebným krkem (Hanzák, 1974).

Pro vyhledávání potravy většinou používají svůj ostrý zrak, kterým prozkoumávají vodu. K lovu jim slouží specificky přizpůsobený zobák, jímž provedou bleskurychlý výpad a lapí tak kořist (Burnie, 2002). Špičatý zobák mají zejména druhy živící se rybami, druhy živící se korýši a červy mají většinou dlouhý, dolů zahnutý zobák. Potravou brodivých jsou živočichové, výjimkou nejsou ani mrchožravé druhy (Hanzák, 1974; Gaisler *et* Zima, 2007). Většina loví samotářsky, zvyšuje se tak úspěšnost při vyčkávání na potravu, ale ke spánku se shromažďují do skupin (Burnie, 2002)

Dlouhé nohy nepoužívají k běhu, ale umožňují jim brodit se v mělké vodě a chodit po měkké bahnitě půdě. Jejich chůze je vždy pomalá, jakmile potřebují prchat, vzlétnou. Mají čtyři dlouhé a ohebné prsty, z nichž přední tři jsou spojeny blánami a čtvrtý, specificky postavený palec, který umožňuje usedání a přidržování ve větvích stromů a taky lezení po trsech rákosových stébel. Tím je určena nejenom oblast jejich bezprostředního výskytu, ale i prostředí, ve kterém nejčastěji získávají potravu (Hudec *et* Šťastný, 1994).

Ptáci z řádu brodiví jsou výborní letci a při letu mají nohy vždy natažené. Vlivem oteplování vzduchu nad pevninou vznikají proudy, s jejichž pomocí jsou tyto ptáci schopni dosáhnout statického plachtění (Gaisler *et* Zima, 2007). Široká křídla mohou mít rozpětí až 2,6 m (Hudec *et* Šťastný, 1994). Jednotlivé druhy jsou za letu odlišitelné na základě toho, zda nechávají krk esovitě prohnutý (volavkovití), nebo ho natahují dopředu (čápopovití a ibisovití) (Hanzák, 1974). Variabilita v ohýbání krku je dána počtem krčních obratlů, kterých může být šestnáct až dvacet, a také zvláštní kloubní úpravou šestého krčního obratle. Tato anatomická adaptace umožňuje esovitě prohnutí krku a funkční přizpůsobení pro harpunovité lovení kořisti u volavek (Hudec *et* Šťastný, 1994).

Zakrnělé hlasové ústrojí (syrinx), často spojené s nevyvinutými hlasovými svaly, má za následek nedostatečný hlasový projev drtivé většiny brodivých ptáků. Náhradou jsou mechanické zvuky vydávané klapáním zobáku (Šťastný *et al.*, 1998).

Brodiví obývají celý svět s výjimkou polárních oblastí, nejrozšířenější jsou v okolí vnitrozemských vod v teplých oblastech a tropech (Šťastný *et al.*, 1998). Hnízdí na stromech nebo v rákosinách, žijí v monogamii. Po celý rok tvoří individuální páry nebo žijí v hnízdních koloniích. Velikost kolonie dosahuje až tisíců párů jedinců, přičemž jednotlivé páry mohou být odlišných druhů. Z větvi a menších klacíků tvoří zpravidla velká hnízda, která stále přistavují v případě, že v nich hnízdí po více let. V severních částech areálu výskytu brodivých jsou druhy stěhovavé, v jižních částech většina druhů přezimuje na svých hnízdech (Hudec *et Šťastný*, 1994).

Krmivá mláďata se líhnou z neskvrnitých vajec, jsou vidoucí a rychle rostou (Hudec *et Šťastný*, 1994). Rodiče se o mláďata starají, natrávenou potravu jim vyvrhují přímo do zobáku. V pozdější fázi vývoje je potrava vyvrhována do hnízda a potomci si ji berou sami. Tito ptáci se dožívají vysokého věku (Šťastný *et al.*, 1998; Gaisler *et Zima*, 2007).

Tuhé, přiléhající obrysové peří mají velké druhy, naopak malé druhy mají peří měkké. Kostrční mazová žláza je zpravidla dobře vyvinutá a porostlá prachovým peřím. V době hnízdění u některých druhů narůstá ozdobné peří (Hudec *et Šťastný*, 1994). Mezi samci a samicemi stejného druhu nejsou velké rozdíly ve zbarvení peří. Na krku jsou poměrně řídké opeření, s jednoduchým zbarvením (Hanzák, 1974; Šťastný *et al.*, 1998).

Důležitým poznatkem je, že některé druhy se vyskytují pouze v malém počtu jedinců, dokonce jsou řazeny mezi kriticky ohrožené a je namístě jejich důsledná ochrana (Šťastný *et al.*, 1998).

Některé zdroje se v klasifikaci čeledí do řádu brodiví liší, Gaisler *et Zima* (2007) uvádějí, že do řádu brodiví patří tři čeledi – volavkovití, ibisovití a čápoovití. Ve starší publikaci (Hanzák *et Hudec*, 1974) jsou zde řazeny i čeledi člunozubcovití a kladivoušovití, které čítají pouze po jednom rodu s jedním zástupcem.

V České republice pravidelně hnízdí bukač velký (*Botaurus stellaris*), bukáček malý (*Ixobrychus minutus*), kvakoš noční (*Nycticorax nycticorax*), čáp černý (*Ciconia nigra*), čáp bílý (*Ciconia ciconia*), volavka stříbřitá (*Egretta garzetta*) a volavka

popelavá (*Ardea cinerea*). Pravidelně je zde vidána volavka bílá (*Ardea alba*) (Šťastný *et al.*, 2006).

3.1.1 Volavkovití

Volavkovití (Ardeidae) jsou nejpočetnější čeledí brodivých. Jsou to ptáci štíhlého vzrůstu, za letu s esovitě prohnutým krkem. Jsou vesměs rybožraví a potravu získávají převážně v mělčinách vnitrozemských vod. Kořist loví velmi prudkým pohybem hlavy s úzkým a velmi špičatým zobákem, při okraji často s ostrými zoubky (Hudec *et* Šťastný, 1994). Zvláštností nejsou ani volavky, které se krmí mimo vodu, typicky se shromažďují v hejnech kolem skotu a jiných velkých savců a živí se hmyzem v jejich bezprostředním okolí (Burnie, 2002). Hnízda si stavějí v okolí vod i v lesích, na stromech, v křovinách a obvykle žijí v koloniích. Mají zakrnělou mazovou kostrční žlázu, proto je obrysové peří chráněno práškovitým pudrem, který vzniká lámáním prachového peří. V době hnízdění narůstá na některých částech těla ozdobné peří a chocholky. Z celé čeledi mají nejsilnější hlasové projevy (Hudec *et al.*, 1994).

Volavkovití jsou děleni do dvou podčeledí: volavky (Ardeinae) a bukači (Botaurinae). Dovedností volavek je, že dokážou velmi dlouho nehnutě stát na místě a případný útok odvracejí prudkým bodnutím zobáku (Hanzák *et* Hudec, 1974). Čeleď volavkovití zahrnuje celkem 60 druhů řazených do sedmi rodů.

3.1.2 Člunozobcovití

Jediným zástupcem čeledi člunozobcovití (Balaenicipidae) je člunozobec velký (*Balaeniceps rex*). Tento nápadně velký pták, dorůstající výšky 150 cm, má nezaměnitelný, mohutně velký zobák, tvarem připomínající střevíc. Zobák je světlejší, oproti zbytku tmavě šedého těla, s krátkou chomáčovitou chocholkou (Gosler, 1994). Při letu má krk zatažený jako volavky. Hnízda si staví v bažinách a v rákosinách. Tvoří stavby z klacíků, rákosů aj., až jeden metr vysoké, do kterých samice snáší dvě zelenomodrá vejce. Obývá tropické oblasti Afriky, konkrétně oblasti v Kongu a Ugandě a v povodí Bílého Nilu. Pro potravu loví ryby, žáby a větší bezobratlé živočichovy (Volf *et* Filex, 1997). Člunozobec je velmi plachý pták, vyskytuje se jednotlivě, někdy v párech a jen velmi zřídka může být součástí malých skupin (Gosler, 1994).

3.1.3 Kladivoušovití

Čeď kladivoušovití (Scopidae) zahrnuje pouze jediný druh kladivouš africký (*Scopus umbretta*). Je to velmi nenápadný hnědý pták s poměrně krátkýma nohama a vysokým, ze strany zploštělým zobákem. Krk za letu nemá esovitě zkroucený, ani natažený, pouze lehce ohnutý (Hanzák *et* Hudec, 1974). Hlava ve tvaru kovadliny je ozdobena výraznou chocholkou. V Africe a v jihozápadní Arábii je kladivouš africký velmi rozšířený. Žije jednotlivě nebo v párech, pouze výjimečně v malých volných hejnech. Hnízdí na stromech i na skalních stěnách, většinou v okolí pomalu tekoucích vod vnitrozemí (Gosler, 1994). Kladivouš staví specifická hnízda, která jsou kulatá, svrchu uzavřená o velikosti až dvou metrů. Tato stavba je velmi pevná a mláďata se i po vzletnutí vracejí do hnízda, protože zde nacházejí bezpečný úkryt (Hanzák *et* Hudec, 1974).

3.1.4 Ibisovití

Ibisovití (Threskiornithidae) jsou středně velcí ptáci, za letu natahují hlavu a krk dopředu, velmi zřídka je pozorováno plachtění. Ibisovití se dělí na podčeledi ibisové a kolpíci a tyto podčeledi jsou od sebe dobře odlišitelné na základě tvaru zobáku. Zobák se zakrnělým jazykem je tenký a zahnutý dolů (ibisové) nebo naopak plochý, na konci rozšířený (kolpíci). Ve spánku zobák zastrkují pod lopatkové peří (Hanzák *et* Hudec, 1974). Ibisovití mají husté opeření, které může být někdy na hlavě, krku a kostrči prodlouženo a po celém těle mají prachové peří (Hudec *et* Šťastný, 1994). Některé druhy mají naopak úplně neopeřenou obličejovou část, která může případně přecházet v holou hlavu a krk (Hanzák, 1974). Potravu, především červy a měkkýše, vyhledávají vpichováním zobáku do mělké půdy nebo procezováním planktonu. Ibisovití ptáci hnízdí koloniálně v teplejších oblastech světa, u nás hnízdí jen výjimečně. Ibisové čítají 25 druhů, kolpíci jen 6 druhů (Gaisler *et* Zima, 2007).

3.1.5 Čápovití

Čeď čápovití (Ciconiidae) zahrnuje velké druhy ptáků s dlouhýma nohama, které jsou do více než poloviny bérce neopeřené a mají poměrně slabě vyvinut palec (Hudec *et* Šťastný, 1994). Zatímco přední prsty jsou spojeny plovací blánou. Výrazně

vzorované peří je laděné do černé, bílé a šedé. Ocas mají pouze krátký a zaoblený (Gosler, 1994). Za letu mají krk natažený dopředu. Široká křídla, využívající při letu, z nich dělají výborné letce a dovolují jim dokonale plachtit. Bez mávnutí křídel umějí nabírat výšku (Hanzák, 1974), Dospělí čápi mají zakrnělé hlasové ústrojí bez hlasových svalů a nevydávají hlas. Jediným akustickým projevem je různě silné klapání zobáku. Potravu sbírají v mělké vodě nebo na souši (Gaisler *et Zima*, 2007).

I přes neustálé spory o taxonomické zařazení některých druhů, je v současné době uznáváno 19 druhů čeledi čápoovití (del Hoyo *et al.*, 1992), avšak kosmopolitně rozšířených je pouze 17, z nichž nejvíce žije v Africe. U nás a celkově v palearktické oblasti se setkáváme pouze se dvěma druhy, konkrétně s čápem černým a čápem bílým, patřícími do rodu čáp (*Ciconia*) (Hudec *et Šťastný*, 1994).

Čeď čápoovití je některými autory členěna do tří tribů: Mycterini, Ciconiini a Leptoptilini (del Hoyo *et al.*, 1992,).

Tribus Ciconiini zahrnuje sedm druhů rodu *Ciconia*. Ve srovnání s ostatními ptáky tohoto rodu jsou to středně velcí čápi, s nijak výrazně velkým zobákem, přizpůsobeným k požívání různého typu potravy (del Hoyo *et al.*, 1992).

Tribus Leptoptilini je možno členit na rody *Ephippiorhynchus*, *Jabiru* a *Leptoptilos*. Všechny druhy ptáků tohoto tribu mají výrazně velké tělo. Zobák může být masivní a kuželovitý (*Leptoptilos*), anebo dlouhý a špičatý, využívaný jako dýka při lovu ryb v mělčinách. Kůže hlavy je řídko opeřená nebo nahá a nažina může přecházet až na krk (del Hoyo *et al.*, 1992).

Tribus Mycterini se skládá z rodů *Mycteria* a *Anastomus*. Pro celý tribus je charakteristický dlouhý, na průřezu kulatý, mírně zahnutý zobák, který se směrem ke špičce zužuje. Zvláštností je zobák ptáků rodu *Anastomus*. Vrchní čelist je většinou rovná a spodní čelist zakřivená, zúžená, čímž vzniká mezi oběma čelistmi mezera. Ta se směrem ke špičce zobáku zmenšuje a je adaptací k získávání potravy, jako například plžů z jejich ulit aj. V oblasti špičky zobáku jsou citlivá místa, která umožňují lov ryb pod vodou. Při lovu v bahnitých vodách by mohlo docházet k znečištění peří, proto mohou mít kůži na hlavě, a případně i na krku, holou. V průběhu námluv se tato kůže zbarvuje do výraznějších barev (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.1.5.1 Nesyt bílý

Taxonomické zařazení nesyta bílého (del Hoyo *et al.*, 1992; Gosler, 1994):

Říše:	Živočichové (Animalia)
Kmen:	Strunatci (Chordata)
Podkmen:	Obratlovci (Vertebrata)
Třída:	Ptáci (Aves)
Podtřída:	Létaví (Neognathae)
Řád:	Brodiví (Ciconiiformes)
Čeleď:	Čápovití (Ciconiidae)
Tribus:	Mycterini
Rod:	Nesyt (<i>Mycteria</i>)
Druh:	Nesyt bílý (<i>Mycteria cinerea</i>)

Nesyt bílý je přibližně jeden metr vysoký pták, dosahující hmotnosti až 3,5 kg. V některých případech se o něm mluví, jako o nesytu bělohlavém (Kůs *et* Pflieger, 2000). Jak je vidět na obrázku č. 1, má dlouhý zobák, obličejová část je lysá a na těle převažuje bílé peří, které na křídlech přechází v pás černého peří.

Volně žije v Asii, konkrétně v oblastech od Indie a Srí Lanky, směrem přes Kambodžu a Malajsii, k Indonéským ostrovům - Sumatra, Jáva a Sulawesi (del Hoyo *et al.*, 1992). Obývá především mělké vody v okolí řek a jezer, výjimkou nejsou ani mořská pobřeží. V blízkosti hustě zarostlých břehů loví nejčastěji ryby a obojživelníky, dále také plazy, korýše a hmyz (Kůs *et* Pflieger, 2000). Hnízda si staví na stromech, nejvhodnějším stanovištěm jsou mangrovové lesy poblíž Kuala Gula, v Peraku na západě Malajsie (Ismail *et* Rahman, 2012). Nejvíce je pozorován v obdobích sucha, zejména v měsících červenec a srpen. Samice snášejí jedno až čtyři vejce do hnízda, které je součástí kolonie (del Hoyo *et al.*, 1992). Taková kolonie může mít až stovku hnízd a společně s nesytami zde často žijí volavky, ibisi a kormoráni (Kůs *et* Pflieger, 2000).

Obrázek č. 1: Fotografie nesyta bílého v ZOO Zlín-Lešná.



Foto: Martin Pokorný

Celosvětová populace nesyta bílého prošla rapidním poklesem, který má za následek snížení počtu jedinců o více než 50 %, na jihu Sumatry došlo v průběhu dvaadvaceti let (r. 1986 - 2008) ke snížení až o 70 %. Odhaduje se, že celkový počet jedinců nesyta bílého je menší než pět a půl tisíce, z toho téměř pět tisíc žije na Sumatře (Iqbal *et al.*, 2012). Nyní je tento druh označován za ohrožený (Anonymous, 2013).

Na jihu Sumatry byla v letech 2001 až 2005 prováděna mnohá pozorování zjišťující lokalizaci a počty jedinců nesyta bílého. Počet však nepřekročil pět set ptáků. V Kambodži a na Malajském poloostrově čítá populace nesyta bílého přibližně sto až sto padesát jedinců a v Thajsku nebo ve Vietnamu nebyly nalezeny dokonce žádné hnízdní kolonie (Iqbal *et Hasudungan*, 2008).

Hlavními příčinami tak radikálního úbytku je ztráta pobřežních stanovišť vlivem rozvoje zemědělství a těžby dřeva, odchyt ptáků pro obchod a potravu (del Hoyo *et al.*, 1992). V závislosti na místě výskytu je tento brodivý pták taktéž ohrožen kontaminací vod chemickými látkami, pesticidy aj. (Ismail *et Rahman*, 2012).

Lovu mlád'at nesyta bílého by měly zabránit kampaně zvyšující povědomí široké veřejnosti, vynucení zpřísnění zákonů a především všeobecná ochrana zbývajících hnízdních oblastí (Iqbal *et al.*, 2012). V nedávné době ukázala například malajská vláda spolu s národními parky a mezinárodními organizacemi velký zájem o ochranu nesyta bílého. Zapojily se společnosti, jako Malaysian Zoological Society, Malaysian Nature Society aj. Primárním cílem bylo zvýšení počtu jedinců tohoto druhu, vznikly programy na chov v zajetí a reintrodukcii nesyta bílého. Příkladem úspěšného chovu v zajetí může být ZOO Negara v Hulu Kelang v Selangoru se stovkou těchto ptáků (Ismail *et al.*, 2011).

3.2 Repetitivní DNA

Pojem repetitivní DNA označuje sekvence DNA, které se v haploidním genomu vyskytují ve více než jedné kopii. Repetice je složena z jednotek repetice, které jsou tvořeny opakováním nukleotidových motivů (Rosypal, 2006).

Geny kódující proteiny tvoří sekvence unikátní DNA, které se v genomu vyskytují pouze v jedné kopii, nebo jen ve velmi malém počtu opakování (McLennan *et al.*, 2013). Unikátní sekvence tvoří méně než polovinu genomické DNA, u některých živočichů, jako jsou např. obojživelníci, mohou být redukovány na minimum a tvořit přibližně 20 % genomu organismu (Lewin, 2000). Úseky DNA nekódující proteiny ani RNA jsou tvořeny identickými nebo podobnými kopiemi několika sekvencí. Tyto sekvence se v genomu mnohonásobně opakují (McLennan *et al.*, 2013). Menší část nekódující DNA tvoří regulační oblasti a introny, zbytek nekódující DNA je tvořen repetitivní DNA (Campbell *et al.*, 2006).

Většina repetitivní DNA nekóduje proteiny (Alberts *et al.*, 1998). Velké množství kopií repetitivní DNA je lokalizováno v oblasti centromery a telomerických sekvencí chromozomu (Snustad *et al.*, 2012).

Repetitivní DNA je charakteristická svou vysokou rychlostí renaturace, na základě tohoto faktu je možno v genomu detekovat vysoce a středně repetitivní sekvence. Vysoce repetitivní sekvence renaturují nejrychleji a představují mnohokrát se opakující velmi krátké sekvence (Lewin, 2000), které dosahují velikosti dvou až třiceti párů bází a tisíce jejich kopií jsou uspořádány přímo jedna za druhou (McLennan *et al.*,

2013). Středně repetitivní DNA je naopak složena z rozmanitých sekvencí, které jsou roztroušeny v genomu v mnoha opakováních (Lewin, 2000).

Na základě uspořádání jednotlivých kopií se repetitivní DNA dělí na sekvence tandemové, poskládané přímo za sebou, a sekvence rozptýlené v rámci celého genomu (McLennan *et al.*, 2013). Zároveň je rozlišována přímá a obrácená repetice. Přímá repetice je charakterizována opakujícími se sekvencemi, které jsou na témže řetězci DNA ve stejném směru. V případě, že se na jednom řetězci DNA nachází opakující se sekvence a na témže řetězci se vyskytuje tatáž sekvence, ale (pozpátku) komplementární k této sekvenci, nazývá se obrácená repetice (př. 5'...TAGC....GCTA...3') (Rosypal, 2006).

3.2.1 Rozptýlená repetitivní DNA

Rozptýlená repetitivní DNA je složena z velmi podobných kopií dané sekvence DNA, které však nejsou totožné. Každá jednotka repetice dosahuje délky 100 až 1000 párů bází a může se v genomu objevovat i v počtu milionu kopií. Hlavním znakem je, že kopie jsou distribuovány jednotlivě po celém genomu. Schopnost přemístění DNA sekvence mají tzv. mobilní genetické elementy, transpozony (Campbell *et* Reece, 2006).

3.2.2 Tandemově uspořádaná repetitivní DNA

Tandemové repetitivní sekvence (repetice) jsou úseky DNA složené z opakujících se jednotek repetice a v důsledku toho dosahují velikosti až deset milionů párů bází. Jednotlivé kopie jsou uspořádány v sériích za sebou (Campbell *et* Reece, 2006).

Vlivem abnormálního zmnožení tandemové repetitivní DNA dochází k řadě genetických poruch. Základním úsekem, který se může extrémně namnožit v průběhu mnoha generací, je nukleotidový triplet lokalizovaný v místě defektního genu. Příkladem takto způsobených genetických poruch jsou syndrom fragilního X, Huntingtonova choroba aj. Tyto poruchy spojené s opakováním tripletů ovlivňují především nervový systém (Schlötterer, 1998; Campbell *et* Reece, 2006).

Tandemově repetitivní DNA se dělí na tři podskupiny označované jako satelity, minisatelity a mikrosatelity. Jasně definovaná hranice mezi jednotlivými podskupinami

není, rozdělují se na základě délky jednotlivých jednotek repetice a délky celé repetice (Bennet, 2000).

3.2.2.1 Satelity

První tandemově repetitivní DNA byla objevena při diferenční ultracentrifugaci. Princip je založen na tom, že se v první řadě naštěpí genomová DNA a v závislosti na hustotním gradientu v centrifugační kyvetě dochází při centrifugaci k pohybu jednotlivých fragmentů DNA. Satelitní DNA byla pojmenována na základě vizuálního hodnocení výsledků. V centrifugační kyvetě je hlavním produktem separovaná genomová DNA a v blízkosti této DNA je možné sledovat ještě další, menší produkt, který představuje satelitní DNA (Campbell *et* Reece, 2006).

Satelitní sekvence je tvořena jednotkami repetice o velikosti až 100 bp a na základě počtu jejich opakování je dána celková velikost repetice. Repetice dosahuje délky v rozmezí od 100 kbp až po několik Mbp. Satelitní DNA je lokalizována v oblasti centromer a tvoří hlavní složku heterochromatinu. Předpokládá se, že satelitní DNA má zásadní úlohu při oddělování chromatid při buněčném dělení (Campbell *et* Reece, 2006). V lidském genomu není satelitní DNA transkribována (Bennet, 2000)

3.2.2.2 Minisatelity

Sekvence minisatelitní DNA je složena z jednotek repetice uspořádaných v tandemu, přičemž každá jednotka repetice dosahuje velikosti až 50 bp (Lewin, 2000). Celková délka repetice je až 20 kbp. Minisatelity jsou typické pro telomerní DNA, jednotku repetice tvoří hexanukleotidová sekvence, zpravidla složená z nukleotidů TTAGGG. Jejich hlavní funkcí je ochrana chromozomálních konců před degradací DNA polymerázou v průběhu replikace DNA (Bennet, 2000). Paradoxně je telomerní sekvence DNA označována jako minisatelit, ale velikostí jednotky repetice odpovídá zařazení do skupiny mikrosatelitů. Důležitou vlastností minisatelitů je hypervariabilita v opakování sekvencí mezi příbuznými jedinci, která může být příkladem genetického polymorfizmu. Tyto repetice jsou využívány k identifikaci jedinců a jejich příbuzenských vztahů v rámci DNA fingerprintingu (McLennan *et al.*, 2013).

3.2.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou úseky DNA, které jsou charakterizovány tandemově se opakujícími sekvencemi nukleotidů, tvořící jednotky repetice dosahující délky maximálně 13 párů bází (Watson *et al.*, 2008), zpravidla o délce jen dvou až šesti párů bází (Zima *et al.*, 2004). Synonymním názvem pro mikrosatelity jsou repetice jednoduchých sekvencí (SSRs = Simple Sequence Repeats) nebo krátké tandemové repetice (STRs = Short Tandem Repeats) (Oliveira *et al.*, 2006). V genomu se nachází velké množství mikrosatelitových sekvencí, které jsou složeny z desítek až stovky kopií jednotek repetice (Campbell *et al.*, 2006) a dle četnosti opakování může celková délka lokusu dosahovat až 150 nukleotidů (Flegr, 2009). Často jsou jednotky repetice v mikrosatelitech tvořeny mono-, di-, tri- a tetranukleotidovými opakujícími se sekvencemi (Ellegren, 2004), přičemž nejčastěji jsou zastoupena dinukleotidová a trinukleotidová opakování a celkově mohou tvořit až 3 % lidského genomu (Tóth *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 2008). Nukleotidové sekvence tvořící mikrosatelity jsou pozorovány jak u prokaryot, tak i u eukaryot. Nacházejí se v kódujících i nekódujících oblastech v rámci celého genomu (Tóth *et al.*, 2000).

Klasifikace na základě struktury opakované sekvence dělí mikrosatelity na dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené. Dokonalé mikrosatelity mají repetici celistvou (např. TATATATATATA), složenou z opakování jedné jednotky repetice, zatímco ostatní typy mikrosatelitů mají v repetici vloženou jednu nebo více nukleotidových bází. Nedokonalé mikrosatelity mají opakování jednotky repetice přerušované jednou vloženou bází a mohou vypadat například takto TATATACTATATA. Přerušované mikrosatelity jsou charakteristické výskytem více než jedné báze, která není součástí jednotky repetice a mohou tvořit například toto uspořádání TATATACGTATATA. Složené mikrosatelity obsahují dvě odlišné opakující se jednotky repetice, což je například TATATAGTGTGT (Oliveira *et al.*, 2006).

Mikrosatelity mají relativně malou délku, vykazují vysoký stupeň polymorfizmu a účastní se organizace chromatinu, regulace DNA rekombinace, transkripce, translace apod. (Christiakov *et al.*, 2006). Velmi významným znakem mikrosatelitů je variabilita v délce a uspořádání sekvencí mikrosatelitového lokusu. Tato variabilita je způsobena velmi častými mutacemi, které vznikají chybami při rekombinaci, jako je nerovnoměrný crossing-over a zpravidla nejčastěji je vysoká variabilita mikrosatelitů výsledkem

sklouznutí nukleotidového řetězce během replikace DNA (Zima *et al.*, 2004). Při mutacích dochází primárně ke zmnožení, nebo naopak ke ztrátám opakující se sekvence (Schlötterer, 1998). Nespornou výhodou mikrosatelitů je také kodominantnost alel a jejich přesná identifikace např. elektroforetickou separací v polyakrylamidovém gelu (Zima *et al.*, 2004). Na chromozomech jsou detekovány homozygotní mikrosatelitové lokusy, které obsahují stejný počet opakování jednotek repetice, a heterozygotní mikrosatelitové lokusy s rozdílným počtem opakování v každé alele (Oliveira *et al.*, 2006).

Mikrosatelity se využívají jako molekulární markery a v rámci polymerázové řetězové reakce (PCR) mohou být relativně snadno amplifikovány, a jsou proto využívány v mnoha oborech biologie a medicíny (Zima *et al.*, 2004). Již v roce 1992 bylo povědomí o tom, že by se mikrosatelity mohly využívat pro sledování genetické variability v populacích a pro zkoumání blízké genetické příbuznosti - otcovství (Ellegren, 1992). Základem *cross-species* PCR amplifikace je, že čím je zkoumaný druh taxonomicky blíže druhu donorovému, tím je nejen vyšší pravděpodobnost amplifikace zkoumaných lokusů, ale i jejich polymorfismus.

3.3 Hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů

Nezbytnou podmínkou pro studium mikrosatelitů a jejich využití je nasednutí specifického, komplementárního páru primerů na oblasti ohraničující mikrosatelitový lokus a následná amplifikace mikrosatelitové sekvence (Dawson *et al.*, 2010).

Při studiu druhů, u kterých dosud nebyly navrženy primery pro mikrosatelitové lokusy, je nutná jejich izolace *de novo*. Základem je fragmentace DNA za použití restričních enzymů nebo ultrazvuku. Následně mohou být fragmenty o specifické délce vloženy do plazmidového vektoru buď přímo nebo pomocí ligace s adaptorem. Vektory jsou transformovány do bakteriální buňky a následným dělením těchto buněk vznikají rekombinantní klony. Alternativou může být hybridizace naštěpené DNA se sondou na nylonové membráně a fragmenty, obsahující mikrosatelitové repetice, jsou klonovány do bakterií. Mikrosatelitové sekvence jsou detekovány sekvenováním a jejich ohraničující oblasti mohou být použity k navrhování primerů (Zane *et al.*, 2002).

Není jednoduché studovat a vyvíjet nové primery pro PCR amplifikaci mikrosatelitů *de novo* pro každý druh zvlášť. Tento proces je velmi časově náročný,

může trvat týdny i měsíce, a s tím jsou spojené i vysoké finanční náklady. Izolace mikrosatelitů je proto prováděna především na specializovaných výzkumných pracovištích nebo v komerčních laboratořích (Dawson *et al.*, 2010). A nelze používat pouze univerzální PCR primery, protože jich je nedostatek. V důsledku toho dochází k rozvoji mikrosatelitové PCR amplifikace mezi blízkými příbuznými druhy, tzv. *cross-species* PCR amplifikace (Primmer *et al.*, 2005)

Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace je úzce spojena s evoluční příbuzností studovaných druhů (Primmer *et al.*, 1996). Je známo, že při *cross-species* PCR amplifikaci dochází k amplifikaci mikrosatelitových lokusů, které mohou být případně polymorfní, u blízkých příbuzných druhů živočichů (Ellegren, 1992). Metoda *cross-species* PCR amplifikace u ptáků byla poprvé testována na 48 ptačích druzích různých čeledí s páry primerů navrženými pro vlaštovku obecnou (*Hirundo rustica*) a lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*). Získané výsledky prokázaly, že s narůstající fylogenetickou vzdáleností mezi druhy se snižuje úspěšnost PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů, které poskytují polymorfní produkt (Primmer *et al.*, 1996). Sledování transferability mikrosatelitů u ptáků je poměrně výhodné, kvůli nízké frekvenci výskytu mikrosatelitů v ptačím genomu (Oliveira *et al.*, 2006).

Při analýze PCR produktů v elektroforetickém gelu mohou způsobovat problémy nulové alely, tvorba *stutter* bandů a alelová homoplazie.

Nulové alely se vyskytují v různé míře u všech druhů organismů a jsou problematické, protože zkreslují výsledky PCR amplifikace (Carlsson, 2008). Jako nulová alela je označena každá alela, která se trvale nedokáže amplifikovat v rámci PCR. Přítomnost nulových alel je dána několika aspekty. Prvním z nich je výskyt bodových mutací nebo inzercí a delecí v ohraničujících oblastech mikrosatelitových lokusů, na které se vážou primery. Tyto změny v nukleotidových sekvencích neumožňují nasednutí primeru a tudíž nedochází k amplifikaci daného lokusu v rámci PCR (Dakin *et al.*, 2004). Dalším důvodem přítomnosti nulových alel je preferenční amplifikace kratších alel (Chapuis *et al.*, 2007). Přítomnost nulových alel znesnadňuje hodnocení výsledků v rámci studia diverzity populace a paternity. Výskyt nulových alel může snižovat genetickou diverzitu populace, protože nulové alely tvoří

falešné homozygoty, což vede k odchylkám od HW rovnováhy a k problémům při analýze rodičovství (Carlsson, 2008).

Stutter bandy jsou popisovány jako tzv. stínové bandy, které vznikají v blízkosti hlavního produktu (Goldstein *et* Schlötter, 2003). Hlavní příčinou tvorby *stutter* bandů je sklouznutí DNA polymerázy v průběhu PCR amplifikace (Daniels *et al.*, 1998). Ke vzniku *stutter* bandů jsou nejvíce náchylné mikrosatelity s dinukleotidovými jednotkami repetice. Zpravidla jsou *stutter* bandy kratší, než hlavní produkt, jen velmi zřídka jsou získávány delší *stutter* bandy, než je velikost hlavního produktu (Goldstein *et* Schlötter, 2003). Problémem při hodnocení výsledků je výskyt *stutter* bandu jedné alely, která překrývá hlavní produkt jiné alely (Walsh *et al.*, 1996).

Homoplazie je pozorovatelná při elektroforetické separaci PCR produktů, kdy vznikají alely identické velikosti (bp), které však nejsou identické původem (Goldstein *et* Schlötter, 2003). Tato identita velikostí alel je způsobena mutacemi, které produkují nové alely (Estoup *et al.*, 2002), mutační rychlostí a časem divergence mezi populacemi (Goldstein *et* Schlötter, 2003).

3.3.1 Mikrosatelity u ptáků řádu brodiví

U ptáků řádu brodiví byly popsány polymorfnní mikrosatelity pouze u několika druhů z čeledi volavkovití, ibisovití a čápoovití.

Volavka velká

V rámci čeledi volavkovití se jako první zabývali navrhováním primerů *de novo* McGuire *et* Noor (2002) u druhu volavka velká (*Ardea herodias*). Autoři použili streptavidinem potažené magnetické částice, na které byly navázány biotinylované oligonukleotidové repetice. Na tyto repetice se zachytily fragmenty genomické DNA obsahující repetitivní sekvence. Na konce fragmentů genomické DNA byly ligovány sekvence s restričními místy pro tvorbu komplementárních konců a následné klonování fragmentů do bakterií. Detailní postup popisuje Hamilton *et al.* (1999). Celkem získali 60 sekvencí obsahujících mikrosatelity, z nichž navrhli primery pouze pro 28 lokusů, které obsahovaly devět a více jednotek repetice. Hledali polymorfismus mikrosatelitů testováním genotypů 40 jedinců. Následnou PCR reakcí a polyakrylamidovou elektroforézou bylo vybráno 26 párů primerů, které tvořily produkt

odpovídající délky. Pro další testování bylo ve výsledku vybráno jen 17 párů primerů, jejichž PCR produkty mohly být spolehlivě hodnoceny. Polymorfismus u volavky velké vykazovalo 15 párů primerů a zbylé 2 páry poskytly monomorfní produkt. Devět párů primerů, které nebyly vybrány pro další testování, tvořily nehodnotitelné produkty, zejména docházelo ke špatné amplifikaci, tvorbě *stutter* bandů nebo vznikalo více nehodnotitelných produktů. Metodou *cross-species* PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitových lokusů na třech příbuzných druzích (volavka bílá, volavka popelavá a volavka jihoamerická) byly u druhu v. bílá a v. jihoamerická úspěšně amplifikovány všechny lokusy, s výjimkou dvou různých lokusů u každého druhu, které neposkytovaly žádný produkt. Jeden lokus nebyl testován u volavky jihoamerické. Při amplifikaci totožných lokusů u volavky popelavé byla úspěšnost nižší, celkem šest lokusů neposkytovalo žádný produkt (McGuire *et* Noor, 2002).

Volavka žlutozobá

Na základě izolace polymorfních mikrosatelitových lokusů *de novo* u volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) byly publikovány dva výzkumy, ve kterých je shrnuta detekce celkem 41 párů primerů amplifikujících polymorfní mikrosatelitové lokusy, které byly testovány metodou *cross-species* PCR amplifikace na příbuzných druzích.

Huang *et al.* (2010) chtěli pro studium genetické diverzity a struktury populací použít nejprve mikrosatelitové markery primárně navržené pro volavku velkou. Tyto markery však nebyly polymorfní. Autoři tedy provedli izolaci specifických primerů *de novo* podle Winkler *et* Weiss (2008) s jistými modifikacemi. Genomická DNA jednoho jedince volavky žlutozobé byla naštěpena a na fragmenty byly ligovány adaptory. Následně byly fragmenty odděleně hybridizovány se značenými sondami, které obsahovaly mikrosatelitové motivy. Tyto fragmenty byly vybrány a použity jako templát pro PCR amplifikaci. Amplifikační produkty byly transformovány do bakterií a byly sekvenovány klony, které obsahovaly repetice. Po odstranění duplicitních sekvencí byly navrženy primery pro 27 lokusů. Amplifikace a polymorfismus těchto mikrosatelitů byl testován na 20 jedincích volavky žlutozobé. Z celkových 27 testovaných párů primerů bylo 9 párů vyřazeno, protože poskytly monomorfní produkt a zbylých 18 párů primerů poskytovalo produkt polymorfní. Markery pro tyto polymorfní mikrosatelitové lokusy byly amplifikovány na dalších pěti příbuzných druzích (volavka stříbřitá, v. pobřežní, v. bílá, v. čínská a v. rusohlavá) a úspěšnost

amplifikace byla od 77,78 % do 100 %, avšak výskyt polymorfizmu autoři neuvádějí (Huang *et al.* 2010).

V rámci výzkumu Dai *et al.* (2013) byly z genomické DNA jednoho jedince volavky žlutozobé detekovány sekvence obsahující di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové mikrosatelitové motivy použitím 454 sekvenování. Dinukleotidové motivy byly vyřazeny, protože takto krátké motivy mohou zapříčinit velké množství sklouznutí DNA polymerázy během PCR a zvyšují pravděpodobnost vzniku *stutter* bandů. Kritéria splňovalo 74 sekvencí, které měly dostatečně dlouhé ohraničující sekvence. K těmto ohraničujícím sekvencím byly navrženy specifické páry primerů a následně byly testovány pomocí PCR na jedincích volavky žlutozobé. Markery, které úspěšně amplifikovaly mikrosatelity, tzn. měly očekávanou délku a vykazovaly dvě a více alel, byly následně použity k PCR amplifikaci 32 nepříbuzných jedinců volavky žlutozobé. Všech 23 polymorfních mikrosatelitových markerů bylo metodou *cross-species* PCR amplifikace zkoumáno na dalších sedmi druzích z čeledi volavkovití (volavka bílá, v. popelavá, v. čínská, v. rusohlavá, v. stříbřitá, v. pobřežní a kvakoš noční) v počtu tří až pěti jedinců. Výsledky ukázaly vysokou úspěšnost této metody, u všech sedmi testovaných druhů došlo k amplifikaci odpovídajícího lokusu, ale míra polymorfizmu byla nižší. Nejúspěšnější amplifikace a detekce polymorfizmu byla u volavky stříbřité, kde sedmnáct lokusů vykazovalo polymorfizmus (Dai *et al.*, 2013).

Volavka červenavá

Pro volavku červenavou (*Egretta rufescens*) bylo navrženo 12 párů primerů. Byly získány repetice z genomické DNA 13 jedinců volavky červenavé. Tyto sekvence byly klonovány do bakteriálních vektorů. Klony obsahující repetice byly sekvenovány a k sekvencím ohraničujícím mikrosatelitové lokusy byly navrženy specifické páry primerů. Na základě PCR amplifikace bylo vybráno 13 párů primerů, které úspěšně amplifikovaly 13 vzorků genomické DNA. Dále byly u těchto primerů optimalizovány podmínky PCR za použití genomické DNA nepříbuzných jedinců volavky červenavé. Jeden z testovaných primerů byl vyloučen pro nedostatečnou amplifikaci napříč všemi jedinci. Výsledný počet navržených primerů je tedy 12 párů a u jednoho z nich (Er41) byla detekována možnost výskytu nulových alel (Hill *et Green*, 2011).

Volavka rusohlavá

Izolace polymorfních mikrosatelitových lokusů pro volavku rusohlavou (*Bubulcus ibis*) byla poprvé provedena v rámci výzkumu Campanini *et al.* (2012). Z krve dvou jedinců byla izolována DNA a následně byla hybridizována s biotinylovanými sondami obsahující repetitivní sekvence. Fragmenty obsahující tyto sekvence se zachytily na magnetické částice potažené steptavidinem. Sekvence obsahující mikrosatelitové repetice byly klonovány do vektoru a následně transformovány do bakterií. Sekvenováním klonů byly nalezeny mikrosatelity a k ohraničujícím sekvencím byly navrženy specifické primery. Mikrosatelity byla amplifikována DNA 35 volavek rusohlavých. Ve výsledku bylo z 32 testovaných lokusů pouze 11 lokusů polymorfních. Tyto polymorfní mikrosatelitové lokusy byly testovány na vzorcích osmi druhů volavkovitých (volavka jihoamerická, v. bílá, v. modrošedá, v. bělostná, v. západní, v. vlasatá, kvakoš noční a k. žlutohlavý), ale autoři neuvádějí údaje o případném polymorfizmu (Campanini *et al.*, 2012).

Kvakoš noční

První výzkum, který se zabýval amplifikací mikrosatelitových lokusů u kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), byl Chang *et al.* (2005). Autoři se snažili využít metodu *cross-species* PCR amplifikace. Zkoumali využití 8 mikrosatelitových lokusů primárně izolovaných pro volavku velkou (McGuire *et Noor*, 2002). Výsledky ukázaly, že s výjimkou jednoho lokusu byly všechny lokusy vysoce polymorfní u kvakoše nočního (Chang *et al.*, 2005).

O čtyři roky později bylo v rámci výzkumu Chang *et al.* (2009) detekováno a izolováno 11 polymorfních mikrosatelitových markerů od kvakoše nočního. Genomická DNA byla izolována ze svalů, následovala identifikace mikrosatelitových lokusů na základě protokolu FIASCO (Zane *et al.*, 2002) a jejich amplifikace pomocí PCR. Produkt PCR byl ligován do plazmidu a klony, které by mohly obsahovat případné mikrosatelitové sekvence, byly sekvenovány. Na základě získaných sekvencí bylo navrženo celkem 11 párů primerů. Tyto páry primerů byly použity k amplifikaci mikrosatelitových lokusů na dalších 32 jedincích kvakoše nočního a poskytovaly polymorfní produkt. Všech 11 párů primerů bylo následně metodou *cross-species* PCR amplifikace testováno na 11 druzích z čeledi volavkovití (volavka červená, v. popelavá, v. čínská, v. rusohlavá, v. stříbřitá, v. prostřední, bukač velký, bukáček černý, b.

východní, b. žlutonohý a b. skořicový). Podmínky PCR byly stejné jako u kvakoše nočního a mnoho lokusů bylo amplifikováno. Údaje o polymorfizmu jednotlivých lokusů autoři neuvádějí (Chang *et al.*, 2009).

Ibis japonský

V rámci čeledi ibisovití se navrhováním primerů nejprve zabývali Ji *et al.* (2004). Autoři hledali polymorfní mikrosatelitové lokusy pro ibise japonského (*Nipponia nippon*). Pro navrhování oligonukleotidových primerů bylo vybráno 19 mikrosatelitových sekvencí, které autoři získali po osekvenování inzertů bakteriálních plazmidů obsahujících repetice. Po následné analýze ve vysoce rozlišovacím agarózovém gelu navrhli 13 párů primerů, u kterých je velmi pravděpodobné, že budou polymorfní v populaci ibisů. Těchto 13 párů primerů bylo dále testováno na základě genotypu více než sta jedinců ibise japonského. Na základě výsledků testování amplifikace pomocí těchto 13 párů primerů u ibise japonského bylo zjištěno, že pouze 8 lokusů je polymorfních. Metodou *cross-species* PCR amplifikace bylo za stejných podmínek amplifikováno 5 polymorfních lokusů na třech příbuzných jedincích ibise černohlavého (*Threskiornis melanocephalus*) a 4 lokusy neposkytovaly polymorfní produkt ani u jednoho druhu (Ji *et al.*, 2004).

Hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů pomocí *cross-species* PCR amplifikace se zabývali Lei *et al.* (2005). Autoři použili k amplifikaci 22 párů primerů navržených pro kapra obecného (*Cyprinus carpio*), kura domácího (*Gallus gallus*) a tura domácího (*Bos primigenius*) a na základě genotypů 30 jedinců ibise japonského detekovali genetický polymorfismus. Polymorfní produkt tvořily 4 páry primerů (2 od kapra a 2 od skotu) se ziskem 2 až 7 alel (Lei *et al.*, 2005).

V rámci výzkumu He *et al.* (2006) bylo pro ibise japonského navrženo ještě dalších 11 párů primerů. Vzorky genomické DNA z 36 ibisů japonských byly použity k detekci mikrosatelitových lokusů pomocí protokolu Hamilton *et al.* (1999) s mírnými modifikacemi. Genomická DNA byla štěpena a ligována se specifickými linkery. Ligované fragmenty hybridizovaly s biotinylovanými oligonukleotidovými sondami. Následně byly tyto fragmenty vychytány na magnetických částicích pokrytých straptavidinem. Sekvence obsahující mikrosatelitové repetice byly transformovány do bakterií a klony byly sekvenovány. K oblastem ohraničujícím mikrosatelitové lokusy byly navrženy primery a lokusy byly testovány na polymorfismus. Ve výsledku 11 párů

primerů poskytovalo polymorfní produkt při testování dvou populací ibise japonského, které čítaly celkem 36 jedinců (He *et al.*, 2006).

Ibis rudý

V rámci výzkumu Santos *et al.* (2006) byla štěpena genomická DNA jednoho jedince ibise rudého (*Eudocimus ruber*) a fragmenty specifické délky byly ligovány s adaptory. Následnou denaturací získali autoři jednovláčkové fragmenty DNA. Tyto fragmenty hybridizovaly s oligonukleotidovými sekvencemi specificky navázanými na magnetické částice. Eluce poskytla fragmenty obsahující repetitivní sekvence a fragmenty byly klonovány do vektoru a transformovány do bakterií. Rekombinantní klony, které obsahovaly mikrosatelitové repetice byly osekvenovány. Na základě získaných sekvencí bylo navrženo 17 párů primerů k 17 mikrosatelitovým lokusům. Nově navržené páry primerů byly podrobeny PCR reakci a produkty této reakce byly separovány v 6% denaturačním polyakrylamidovém gelu. Na základě genotypové analýzy bylo vybráno 10 polymorfních lokusů a jejich amplifikace a polymorfismus byly testovány v rámci tří různých populací tohoto druhu (Santos *et al.*, 2006).

Kolpík růžový

V genomické DNA kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*) bylo detekováno celkem 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Fragmenty genomické DNA byly ligovány do plazmidu a z rekombinantních fragmentů byly vybírány ty, které tvoří mikrosatelitové sekvence. DNA fragmenty byly denaturovány a hybridizovaly s oligonukleotidy obsahujícími mikrosatelitové sekvence. Takto hybridizované úseky DNA byly specificky vychytávány na magnetické částice. Elucí získané fragmenty autoři ligovali do vektorů a transformovali do buněk. Klony byly selektovány přenosem na membránu a hybridizací se značenou sondou. Selekcí hybridizovaných klonů, které obsahují mikrosatelitové repetice, a následným osekvenováním byly získány mikrosatelitové lokusy, pro které byly následně navrženy primery. Lokusy, které vykazovaly polymorfismus, byly využívány k testování dalších jedinců kolpíka růžového. Sawyer *et al.* (2006) taktéž uvádějí, že polymorfismus lokusu Aaju4 byl určen dvěma alelami a že alela o velikosti 161 bp byla spojena s W chromosomem samic a alela o velikosti 200 bp byla spojena se Z chromozomem.

Kolpík malý

Do celkového počtu detekovaných polymorfních mikrosatelitových lokusů pro čeleď ibisovití je nutno zařadit ještě 23 těchto lokusů a následně navržených 23 párů primerů pro kolpíka malého (*Platalea minor*). Ve výzkumu Yeung *et al.* (2009) fragmenty genomické DNA hybridizovaly s biotinylem značenými oligonukleotidy obsahujícími repetice. Hybridizované fragmenty byly zachyceny na částice potažené streptavidinem a následně eluovány. Po jejich PCR amplifikaci byly produkty transformovány do bakterií a přeneseny na membránu, kde opět hybridizovaly se značenými oligonukleotidy obsahujícími repetitivní sekvence. Na základě sekvenování pozitivních klonů obsahujících mikrosatelitové repetice bylo navrženo 64 potenciálně použitelných párů primerů. Ve výsledku pouze 23 z nich amplifikovalo DNA fragmenty odpovídající délky u 20 testovaných jedinců kolpíka malého. Zároveň také metodou *cross-species* PCR amplifikace bylo těchto 23 párů primerů testováno na jednom jedinci od kolpíka růžového, ibise rudého, ibise posvátného, kvakoše nočního a volavky bílé. Autoři uvádějí pouze úspěšnost amplifikace, nikoliv zda získali polymorfní produkt (Yeung *et al.*, 2009).

Nesyt lesní

V rámci čeledi čápoovití byly první mikrosatelitové lokusy nalezeny u nesya lesního (*Mycteria americana*). Na základě výzkumu van den Bussche *et al.* (1999) byla genomická DNA 67 jedinců ze sedmi kolonií štěpena restrikcími endonukleázami. Výsledné fragmenty byly podrobeny elektroforetické separaci v 0,8% agarózovém gelu a denaturované produkty byly přeneseny na nylonovou membránu. Na membráně byly detekovány fragmenty obsahující mikrosatelitové repetice pomocí hybridizace se specifickou sondou. Následnou izolací a sekvenováním mikrosatelitových lokusů byly navrženy primery ke 4 mikrosatelitovým lokusům, které byly použity ke zkoumání genetických změn uvnitř a mezi koloniemi nesya lesního (van den Bussche *et al.*, 1999).

Pro tento druh bylo o několik let později identifikováno dalších 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů v rámci výzkumu Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003). Genomická DNA nesya lesního byla hybridizována se značenými mikrosatelitovými oligonukleotidy. Použitím PCR byly detekovány fragmenty DNA obsahující mikrosatelitové sekvence a tyto byly následně ligovány do vektoru. Pozitivní bakteriální

klony byly selektovány použitím β -galaktozidázového genu a bílé kolonie (pozitivní) byly osekvenovány. Pro sekvence ohraničující mikrosatelity byly navrženy primery a optimalizovány na vzorcích DNA nesyta lesního z různých kolonií. Ve výsledku bylo detekováno 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů, které poskytovaly od 2 do 4 alel (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003).

Čáp bílý

U čápa bílého (*Ciconia ciconia*) bylo detekováno celkem 13 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Shephard *et al.*, 2009). V rámci jejich výzkumu byly z genomické DNA jednoho čápa bílého izolovány repete, ke kterým byly navrženy páry primerů. Pomocí PCR bylo zjištěno, že pouze 7 lokusů bylo variabilních. *Cross-species* PCR amplifikací dále našli 6 polymorfních mikrosatelitů s využitím 6 párů primerů navrženými pro nesyta lesního (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003).

Dalších 6 mikrosatelitových lokusů odvozených od čápa bílého naší laboratoři laskavě poskytl pan prof. Segelbacher.

Čáp východní

Huang *et Zhou* (2011) metodou *cross-species* PCR amplifikace otestovali 7 párů primerů, které byly navrženy pro čápa bílého, 12 párů primerů navržených pro ibise japonského a 17 párů primerů navržených pro volavku velkou na genomické DNA čápa východního (*Ciconia boyciana*) (McGuire *et Noor*, 2002; He *et al.*, 2005; Shephard *et al.*, 2009). Polymorfizmus mikrosatelitových lokusů byl testován na 23 jedincích čápa východního. Polymorfizmus vykazovalo celkem 11 mikrosatelitových lokusů (Huang *et Zhou*, 2011). Izolací polymorfních mikrosatelitových lokusů *de novo* u čápa východního bylo nalezeno celkem 8 nových lokusů.

Autoři Wang *et al.* (2011) použili velmi podobný postup pro získání polymorfních mikrosatelitových lokusů, jako v práci Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003). Na základě selekce pozitivních klonů a jejich osekvenování bylo navrženo 14 párů primerů, z nichž 8 párů amplifikovalo mikrosatelitové lokusy a bylo následně použito po další analýzy. Metodou *cross-species* PCR amplifikace bylo dále testováno 9 mikrosatelitových markerů primárně navržených pro nesyta lesního, které byly publikovány v práci Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003). Pouze 3 z těchto

mikrosatelitových lokusů byly amplifikovány u čápa východního a zároveň poskytovaly polymorfni produkt (Wang *et al.*, 2011).

3.3.2 Mikrosatelity u ptáků řádu potápky

Potápka rudokrká

Z naštěpené genomické DNA potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*) byly získány fragmenty, které byly klonovány a prověřeny na přítomnost repetitivní sekvence podle Hughes *et Queller* (1993). Klony obsahující mikrosatelitové sekvence byly osekvenovány a k získaným sekvencím byly navrženy primery. S těmito primery byla provedena PCR a produkty byly separovány v 6% denaturujícím polyakrylamidovém gelu. Bylo amplifikováno 7 polymorfni mikrosatelitových lokusů u 87 jedinců. Metodou *cross-species* PCR amplifikace bylo testováno 6 polymorfni mikrosatelitových lokusů na pěti jedincích pěti druhů potápek a pěti jedincích jednoho mezidruhového křížence: potápka černokrká (*Podiceps nigricollis*), p. žlutorohá (*P. auritus*), p. americká (*Podilymbus podiceps*), p. západní (*Aechmophorus occidentalis*), p. Clarkova (*A. clarkii*) a hybrid p. západní a p. Clarkovy (*A. occidentalis/clarkii*). Byla testována amplifikace těchto lokusů. Autoři získali u jednotlivých druhů 1 až 5 polymorfni produktů se 2 až 7 alelami. Výjimkou byla potápka černokrká, u které nevznikl žádný polymorfni produkt a naopak nejlepší amplifikace se 7 polymorfni mikrosatelity byla u potápky žlutorohé (Sachs *et Hughes*, 1999).

Potápka západní

Hledáním polymorfni mikrosatelitových lokusů od potápky západní se zabývala Humple (2009). Z genomické DNA si autorka nechala vytvořit knihovny s mikrosatelitovými repeticemi pomocí GIS (Genetic Identification Services) z Chatsworth, Californie. Dále osekvenovala 69 sekvencí, které potenciálně obsahovaly mikrosatelitové lokusy. Na základě příslušné délky repetice vybrala 25 z nich, k nim navrhla specifické primery. Amplifikované lokusy byly hodnoceny v 8% polyakrylamidovém gelu. Polymorfni produkt (2 až 8 alel) poskytovalo 11 lokusů. Amplifikace těchto lokusů byla testována ještě na dalších 15 až 16 jedincích od potápky západní a 16 jedincích potápky Clarkovy. Všechny lokusy, které poskytovaly polymorfni produkt u potápky západní, byly polymorfni i u potápky Clarkovy a poskytly 2 až 10 alel na lokus (Humple, 2009).

3.3.3 Mikrosatelity u ptáků řádu potáplice

Potáplice lední

McMillan *et al.* (2004) popsali ve své práci izolaci mikrosatelitových lokusů u potáplice lední (*Gavia immer*). Mírnou modifikací protokolu dle Glenn *et al.* (2000) byla extrahovaná DNA obohacena o repetitivní sekvence a naštěpena restričními enzymy. Výsledné segmenty hybridizovaly s biotinylem značenými oligonukleotidy, které obsahují mikrosatelitové repetice. Fragmenty, které se hybridizovaly se sondou byly vychytávány na částice se streptavidinem a amplifikovány pomocí PCR. Amplikony byly ligovány a transformovány do buněk. Klony obsahující inzerty byly amplifovány a zachyceny na membráně a detekovány navázáním značených sond. Klony obsahující mikrosatelity byly osekvenovány a na základě získaných sekvencí byly navrženy specifické primery. Pomocí PCR byla testována amplifikace a polymorfismus mikrosatelitových lokusů v 5% polyakylamidovém gelu. Polymorfismus vykazovalo 7 mikrosatelitových lokusů (McMillan *et al.*, 2004).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Biologickým materiálem jsou vzorky krve pěti jedinců nesyta bílého (*Mycteria cinerea*), ze kterých byla extrahována genomická DNA. Vzorky krve byly odebrány pracovníky ZOO Zlín-Lešná a před izolací byly uchovány v Queen's pufu (Seutin *et al.*, 1991).

Izolaci genomické DNA provedl vedoucí bakalářské práce RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D. metodou fenol-chloroformové izolace DNA na základě postupu převzatého dle Maniatis *et al.* (1982) a upraveného pro materiálové a technické vybavení Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

4.2 PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů

Amplifikace genomické DNA nesyta bílého byla testována pomocí PCR s použitím 229 párů primerů. Primery byly primárně navrženy pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů u 15 druhů z řádu brodiví, 2 druhů potápek, 1 druhu potáplice a 4 druhů vrubozobých. Všechny páry primerů byly otestovány PCR amplifikací DNA 5 jedinců nesyta bílého a mikrosatelity, ke kterým byly navrženy jsou uvedeny v tab. č. 1.

Tabulka č. 1: Mikrosatelitové lokusy testované u nesyta bílého (*Mycteria cinerea*) spolu s druhem, ze kterého byly lokusy izolovány, zařazení těchto druhů do řádů a autory publikací, ve kterých byly lokusy poprvé uvedeny.

Mikrosatelitový lokus	Zdrojový druh	Řád	Literární zdroj
Ah205, Ah208, Ah209, Ah210, Ah211, Ah212, Ah217, Ah320, Ah341, Ah343, Ah414, Ah421, Ah517, Ah522, Ah526, Ah536, Ah630	Volavka velká (<i>Ardea herodias</i>)	Brodiví (Ciconiiformes)	McGuire <i>et al.</i> , 2002

Tabulka č. 1: Pokračování 1.

Mikrosatelitový lokus	Zdrojový druh	Řád	Literární zdroj
Er21, Er22, Er23, Er24, Er31, Er41, Er42, Er43, Er44, Er45, Er46, Er51	Volavka červenavá (<i>Egretta rufescens</i>)	Brodiví (Ciconiiformes)	Hill <i>et al.</i> , 2001
Ae01, Ae04, Ae05, Ae09, Ae13, Ae24, Ae25, Ae26, Ae27, Ae28, Ae30, Ae35, Ae36, Ae37, Ae38, Ae42, Ae44, Ae47	Volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)		Huang <i>et al.</i> , 2010
Ee04, Ee06, Ee10, Ee17, Ee18, Ee20, Ee22, Ee23, Ee24, Ee26, Ee28, Ee30, Ee33, Ee34, Ee37, Ee41, Ee42, Ee43, Ee44, Ee45, Ee46, Ee50, Ee51			Dai <i>et al.</i> , 2013
nycti14, nycti15, nycti22, nycti26, nycti35, nycti36, nycti41, nycti43, nycti62, nycti68, nycti74	Kvakoš noční (<i>Nycticorax nycticorax</i>)		Chang <i>et al.</i> , 2009
Aaju1, Aaju2, Aaju3, Aaju4, Aaju5, Aaju6	Kolpík růžový (<i>Ajaia ajaja</i>)		Sawyer <i>et al.</i> , 2006
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, PM3-31	Kolpík malý (<i>Platalea minor</i>)		Yeung <i>et al.</i> , 2009
Bi01, Bi08, Bi13, Bi15, Bi18, Bi20, Bi22, Bi26, Bi28, Bi29, Bi30	Volavka rusohlavá (<i>Bubulcus ibis</i>)		Camparini <i>et al.</i> , 2012

Tabulka č. 1: Pokračování 2.

Mikrosatelitový lokus	Zdrojový druh	Řád	Literární zdroj
Eru02, Eru03, Eru04, Eru05, Eru06, Eru07, Eru08, Eru09, Eru10 Eru11	Ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Brodiví (Ciconiiformes)	Santos <i>et al.</i> , 2006
NnAF4, NnBF7, NnCE11, NnCG3, NnDD9, NnEB12, NnHB12, NnNF5, NnEA9, NnAD10, NnEH10, NnGF4, NnLF11	Ibis japonský (<i>Nipponia nippon</i>)		Ji <i>et al.</i> , 2004
Nn01, Nn03, Nn04, Nn12, Nn16, Nn17, Nn18, Nn21, Nn23, Nn25, Nn26			He <i>et al.</i> , 2006
Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168, Cbo235	Čáp východní (<i>Ciconia boyciana</i>)		Wang <i>et al.</i> , 2011
Cc01, Cc02, Cc03, Cc04, Cc05, Cc06, Cc07	Čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)		Shephard <i>et al.</i> , 2009
CC1, CC3, CC7, CC9, CC10, CC13			Segelbacher, osobní sdělení
WS1, WS2, WS4, WS6			van den Bussche <i>et al.</i> , 1999
WSμ03, WSμ08, WSμ09, WSμ13, WSμ14, WSμ17, WSμ18, WSμ19, WSμ20, WSμ23, WSμ24	Nesyt lesní (<i>Mycteria americana</i>)		Tomasulo- Seccomandi <i>et al.</i> , 2003
PgAAT1, PgAAT3, PgAAT6, PgAAT8, PgAAT25, PgAAT34, PgAAT41	Potápka rudokrká (<i>Podiceps grisegena</i>)		Potápky (Podicipediformes)
B8, B11, B102, B112b, B113, C5, E202, G118, G206, G209, G215	Potápka západní (<i>Aechmophorus occidentalis</i>)	Humple, 2009	

Tabulka č. 1: Pokračování 3.

Mikrosatelitový lokus	Zdrojový druh	Řád	Literární zdroj
GimA9, GimA12, GimC5, GimC11, GimD9, GimD12, GimE11	Potáplice lední (<i>Gavia immer</i>)	Potáplice (Gaviiformes)	McMillan <i>et al.</i> , 2004
APH07, APH08, APH09, APH12, APH13, APH16	Kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Vrubozobí (Anseriformes)	Maak <i>et al.</i> , 2000
CmAAT16, CmAAT35, CmAAT38	Kachna pižmová (<i>Cairina moschata</i>)		Stai <i>et Huges</i> , 2003
Blm1, Blm10, Blm12	Kachnice laločnatá (<i>Biziura lobata</i>)		Guay <i>et Mulder</i> , 2005
Smo10	Kajka mořská (<i>Somateria mollissima</i>)		Paulus <i>et Tiedemann</i> , 2003

Jednotlivé složky a objemy PCR reakční směsi, které jsem pipetovala, jsou uvedeny v tabulce č. 2. Výsledný objem PCR reakční směsi je dostačující pro testování pěti vzorků genomické DNA nesyta bílého a navíc je počítáno s případnými ztrátami v průběhu pipetování.

Tabulka č. 2: Složení a přesné objemy jednotlivých složek PCR reakční směsi.

Složky PCR směsi	Objem [μl]
Deionizovaná voda	44,6
Reaction Buffer 10x	6,7
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (20 μmol/l)	0,7
Primer F (10 μmol/l)	3,3
Primer R (10 μmol/l)	3,3
aTaq DNA polymeráza 5 U/μl	1,0

Chemikálie jsou předem promíchány na vortexu a centrifugovány v minicentrifuze. Poté jsou pipetovány přesné objemy jednotlivých složek PCR reakční směsi do 1,5ml mikrozkušavky. Celková reakční směs je opět protřepána na vortexu a centrifugována. Do předem připravených PCR mikrozkušavek je pipetován 1 μ l genomické DNA každého z pěti testovaných jedinců. PCR reakční směs je pipetována v objemu 9 μ l do všech pěti mikrozkušavek.

Takto připravené vzorky o objemu 10 μ l vložíme do termocykléru, kde probíhá polymerázová řetězová reakce dle níže uvedeného teplotního a časového profilu:

5 min	94 °C	} 35x
30 s	94 °C	
30 s	zvolená teplota <i>annealingu</i>	
30 s	72 °C	
7 min	72 °C	
Bez omezení	10 °C	

Základní teplota *annealingu* byla nastavena na 50 °C pro testování všech párů primerů. Tato teplota byla dále upravována v rozmezí 44 - 68 °C. Pokud testovaný pár primerů neposkytl produkt, byla teplota snížena postupně až na 44 °C. Naopak, pokud primery poskytly polymorfní produkt, ale jednotlivé alely od sebe nebyly rozlišitelné, byla teplota zvyšována až na hodnotu 68 °C.

4.3 Zpracování PCR produktů

Pro zpracování PCR produktů je použita vyhřívaná sekvenační elektroforetická komora S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm. Tloušťka gelu odpovídá tloušťce spacerů a ta je 0,4 mm.

1. Elektroforetická skla jsou omyta deionizovanou vodou, popř. saponátem a v digestoři osušena papírovým ručníkem. Poté je nanesen 96% etanol na plochy skel, které se budou dotýkat gelu a je utřen do sucha.
2. Na větší sklo je nanesen přípravek na odpuzování vody ze skel automobilů na ploše, která se bude dotýkat gelu. Po cca pěti minutách schnutí je sklo na této

ploše dvakrát umyto menším množstvím destilované vody a opět otřeno do sucha papírovým ručníkem.

3. U menšího skla je na plochu, která se bude dotýkat gelu, dvakrát nanesen 96% etanol a utřen do sucha. Dále je tato plocha ošetřena roztokem molekulárního lepidla. Po nanesení a důkladném rozetření po skle se molekulární lepidlo nechá pět minut zaschnout. Sklo je na této ploše dále čtyřikrát ošetřeno 96% etanolem a mezi každým nanesením je otřeno papírovým ručníkem.
4. Při okraji delších hran skla jsou na větší sklo dány dva 0,4 mm silné spacers na ploše, která bude v kontaktu s gelem. Skla jsou ošetřeny plochami dána k sobě tak, aby guma spacerů těsně doléhá k hraně menšího skla. Takto jsou skla zajištěna po obvodu delších hran 4 klipsy proti případnému pohybu.
5. Do prostoru mezi obě zajištěná skla se nalije polyakrylamidový gel (6%) a je vložen hřebínek. Ten směřuje rovnou stranou mezi skla přibližně do hloubky 1 cm od okraje. Hřebínek je zajištěn velkými klipsy. Gel polymerizuje 50 - 60 minut.
6. Skla se ztuhlým gelem jsou omyta vodou, stěrkou zbavena přebytečné vody a vložena do elektroforetické komory tak, že menší sklo je těsně přiloženo k vyhřívané ploše elektroforetické komory. Větší sklo směřuje ven a hřebínek je navrchu. Skla jsou upevněna pomocí šroubů a je zavřen boční ventil pro vylití pufru.
7. Do prostoru pod a nad sklem se nalije 0,5 x TBE pufr a opatrně se vyndá hřebínek. Prostor po hřebíku je očištěn od zbytků gelu proudem pufru ze stříkačky.
8. Elektroforetická komora je připojena ke zdroji stejnosměrného proudu, kde je nastaven elektrický proud 150 mA, napětí 3000 V a výkon 90 W. Skla jsou takto nahřívána po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby je prostor pro nanášení vzorků očištěn od zbylého přebytečného gelu a je nasazen hřebínek. Zuby hřebínku zasahují přibližně 1 mm pod okraj gelu.
9. Vzorky v PCR mikrozkušnicích je potřeba smíchat s 5 μ l nanášecího pufru a na 3 minuty denaturovat v termocykléru.

10. Takto připravené vzorky jsou nanášeny v objemu 2 μl pomocí osmikanálové mikropipety do prostorů mezi zuby hřebínku.
11. Po nanesení všech vzorků je připojen zdroj stejnosměrného proudu. Probíhá elektroforetická separace při elektrickém proudu 150 mA, napětí 3000 V a výkonu 70 W. Separace probíhá 1,5 až 3 hodiny.
12. V průběhu separace vzorků jsou připraveny roztoky fix/stop, 1% HNO_3 a vývojka. Vývojka se musí umístit do ledničky, aby se vychladila na teplotu nižší, než je 10 $^{\circ}\text{C}$.
13. Po dokončení elektroforetické separace jsou odpojeny elektrody a je vypnut zdroj. Boční ventil je nutno otevřít a po vypuštění pufry jsou skla uvolněna z elektroforetické komory.
14. Skla jsou přenesena na rovný povrch, kde jsou vytaženy spacers a pomocí nože jsou oddělena obě skla od sebe. Na menším skle zůstává gel. Toto sklo je dáno do misky na třepačce. Sklo je zalito fix/stop roztokem a je jím promýváno po dobu 20 minut.
15. Po uplynutí této doby je fix/stop slit zpět pro další použití. Sklo s gelem je promyto vodou třikrát po cca 2 minutách. Miska se sklem je umístěna zpět na třepačku. Gel je zalit roztokem 1% HNO_3 na dobu maximálně 5 minut. Poté je potřeba gel pořádně promýt, a to čtyřikrát po 2 minutách.
16. Sklo s gelem je přeneseno do druhé misky. Do 0,1% roztoku AgNO_3 je přidáno 1,2 ml formaldehydu a tímto je sklo v misce zalito na dobu 30 minut.
17. Před dalším krokem je nachystána miska s deionizovanou vodou a jedna další miska, ve které bude sklo zalito vývojkou. Roztok AgNO_3 je možno slit zpět do láhve. Sklo s gelem je vloženo do misky s vodou na dobu maximálně 20 s. Poté je sklo přeneseno do poslední misky a zalito vývojkou, do které je těsně před tím pipetováno 1,2 ml formaldehydu a 160 μl thiosíranu sodného.
18. Na skle je pozorován vývoj tmavých bandů separovaných úseků DNA. Po dostatečném ztmavnutí všech bandů pro vyhodnocení výsledků je gel zalit fix/stop roztokem. Až když se přestane uvolňovat CO_2 ve formě bublin, je gel dán opět do misky s vodou a poté vloženo do sušárny, předežháté na 90 $^{\circ}\text{C}$. Zde je sušen cca 30 min a dále vyhodnocen na negatoskopu.

4.4 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/ μ l), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (100 mmol/l, 400 μ l každého), U 1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovat Vrbátky)
- Ethylendiamintetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachema)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Lachema)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Chloroform (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná (65% roztok) (Lachema)
- Kyselina octová (ledová) (Lachema)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)
- N,N'-methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)

- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Clear Vue, Rain Repellent, přípravek na odpuzování vody ze skel automobilů (Turtle WAX)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.5 Použité roztoky

Akrylamid (6% zásobní roztok)

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

Polyakrylamidový gel (6%)

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

Molekulární lepidlo

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

Fix/stop roztok

- 88 ml ledové kyseliny octové
- 800 ml deionizované vody

Akrylamid:N,N'- methylenbisakrylamid 19:1 (40% zásobní roztok)

- 380 g akrylamidu
- 20 g N,N'- methylenbisakrylamidu
- rozpustit v 500 ml deionizované vody a doplnit do objemu 1 l
- roztok uložit v temné láhvi ve 4 °C

Peroxodisíran amonný (NH₄)₂S₂O₈ (10% zásobní roztok)

- 1 g (NH₄)₂S₂O₈ rozpustit v 10 ml deionizované vody
- uchovávat ve falkonce v lednici při 4 °C

Nanášecí pufr

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

TBE pufr (10 x zásobní roztok)

- 108 g Tris
- 55 g kyseliny borité H₃BO₃
- 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou do objemu 1 l

Kyselina dusičná HNO₃ (1% roztok)

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

Dusičnan stříbrný AgNO₃ (0,1% roztok)

- 0,8 g AgNO₃
- 800 ml deionizované vody
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Vývojka

- 24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3
- 800 ml deionizované vody
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μl thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

4.6 Přístrojové vybavení

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy MARK S 622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette 0,5 μl až 10 μl (osmikanálová) (Labsystems)
- Mikropipety Finnpiette 0,3 μl až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 μl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komora S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna – sterilizátor CAT 8050 (Contherm)
- Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)
- Termocyklér GenePro (BIOER Technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér XP Thermal Cycler (BIOER technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)

- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5 Výsledky

6 Diskuze

7 Závěr

V rámci mé bakalářské práce jsem testovala DNA 5 jedinců nesyta bílého (*Mycteria cinerea*), kteří jsou chováni v zajetí v ZOO Zlín-Lešná. Metodou *cross-species* PCR amplifikace jsem amplifikovala mikrosatelitové lokusy odvozené od jiných řádů a čeledí. Celkem tak bylo testováno 229 párů primerů. Od druhů z řádů brodiví (Ciconiiformes), potápky (Podicipediformes) a potáplice (Gaviiformes) se jednalo o všechny dosud navržené páry primerů k polymorfním mikrosatelitovým lokusům. Taktéž byly testovány některé vybrané páry primerů navržené pro zástupce řádu vrubozobí (Anseriformes).

Ve výsledku bylo nalezeno 26 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Sedm z nich bylo amplifikováno primery, které byly navrženy k mikrosatelitovým lokusům od čápa bílého (*Ciconia ciconia*), po třech lokusech bylo amplifikováno primery od čápa východního (*Ciconia boyciana*), ibise rudého (*Eudocimus ruber*) a volavky červenavé (*Egretta rufescens*), po dvou lokusech od kolpíka malého (*Platalea minor*), kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*) a po jednom lokusu od nesyta lesního (*Mycteria americana*), ibise japonského (*Nipponia nippon*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*), volavky velké (*Ardea herodias*) a potápky západní (*Aechmophorus occidentalis*). Největší procento polymorfních mikrosatelitových lokusů u nesyta bílého bylo získáno při použití párů primerů odvozených od druhů z rodu *Ciconia*. Vysvětlením je fylogenetická blízkost mezi nesytem bílým a těmito druhy. Tento poznatek však nesouhlasí se získáním pouhého jednoho polymorfního mikrosatelitového lokusu od nesyta lesního, který patří do stejného rodu jako nesyt bílý.

8 Seznam zkratek

- A adenin
- bp pár bází (*base pare*)
- C cytozin
- DNA deoxyribonukleová kyselina
- G guanin
- HW rovnováha Hardy-Weinbergova rovnováha
- PCR polymerázová řetězová reakce
(*Polymerase Chain Reaction*)
- SSRs repetice jednoduchých sekvencí
(*Simple Sequence Repeats*)
- STRs krátké tandemové repetice
(*Short Tandem Repeats*)
- T thymin

9 Použitá literatura

- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1998): *Základy buněčné biologie*, 2. vydání, Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem.
- Anonymous (2013): The IUCN Red List of Threatened SpeciesTM. Verze 2013.2. www.iucnredlist.org, navštíveno dne 12. 2. 2014.
- Bennett P (2000): Demystified... Microsatellites. *Molecular Pathology* 53, 177-183.
- Burianová E (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro detekci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce, Depon. in: Knihovna biologických oborů, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Burnie D (Ed.) (2002): *Zvíře*. Knižní Klub, Praha.
- van den Bussche RA, Harmon SA, Baker RJ, Bryan AL, Rodgers JA, Harris MJ, Brisbin IL Jr (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the wood stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 4, 1083-1092.
- Cahlíková R (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Diplomová práce, Depon. in: Knihovna biologických oborů, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Campanini EB, Sanches A, Hatanaka T, del Lama SN (2012): Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from cattle egret (*Bulbulcus ibis*) and cross-amplification in other Ardeidae species. *Conservation Genetic Resources* 4, 707-709.
- Campbell NA, Reece JB (2006): *Biologie*. Computer Press, Brno.
- Carlsson J (2008): Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 6, 616-623.
- Dai Y, Zhou X, Fang W, Lin Q, Chen X (2013): Development and cross-species transferability of 23 microsatellite markers from the vulnerable Chinese Egret

- (*Egretta eulophotes*) using 454 sequencing. *Conservation Genetics Resources* 5, 1035-1038.
- Dakin EE, Avise JC (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504-509.
 - Daniels J, Holmans P, Williams N, Turic D, McGuffin P, Plomin R, Owen MJ (1998): A simple method for analyzing microsatellite allele image patterns generated from DNA pools and its application to allelic association studies. *The American Journal of Human Genetics* 62, 1189-1197.
 - Dawson DA, Horsburgh GJ, Küpper C, Stewart IRK, Ball AD, Durrant KL, Hansson B, Bacon I, Bird S, Klein A, Krupa AP, Lee JW, Gálvez DM, Simeoni M, Smith G, Spurgin LG, 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.
 - Ellegren H (1992): Polymerase-Chain-Reaction (PCR) analysis of microsatellites - a new approach to studies of genetic relationships in birds. *The Auk* 4, 886-895.
 - Ellegren H (2004): Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Review Genetics* 5, 435-445.
 - Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.
 - Flegr J (2009): *Evoluční biologie*, vydání 2., opravené a rozšířené. Academia, Praha.
 - Gaisler J, Zima J (2007): *Zoologie obratlovců*, 2. přepracované vydání. Academia, Praha.
 - Glenn TC, Cary T, Dust M, Houswaldt S, Prince K, Clifton R, Shute I (2000): Microsatellite isolation. www.uga.edu/srel/DNA_Lab/protocols.htm.
 - Gosler A (1994): *Atlas ptáků světa*. Příroda a. s, Bratislava.
 - Goldstein DB, Schlötterer Ch (Eds.) (2003): *Microsatellites: Evolution and application*. Oxford University Press, Eastbourne.

- Guay PJ, Mulder RA (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.
- Hamilton MB, Pincus EL, DiFiore A, Fleischer RC (1999): Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* 27, 500-507.
- Hanzák J (1974): Velký obrazový atlas ptáků. ARTIA, Praha.
- Hanzák J, Hudec K (1974): Světem zvířat, II. díl - 1. část, Ptáci. Albatros, Praha.
- He LP, Wan QH, Fang SG, Xi YM (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics* 7, 157-160.
- Hill A, Green MC (2011): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* 3, 13-15.
- del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.
- Huang X, Zhou X, Chen M, Fang W, Chen X (2010): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics* 11, 1211-1214.
- Huang Y, Zhou L (2011): Screening and application of microsatellite markers for genetic diversity analysis of Oriental White Stork (*Ciconia boyciana*). *Chinese Birds* 1, 33-38.
- Hudec K, Šťastný K (1994): Fauna ČR a SR, Ptáci, 2. přepracované a doplněné vydání. Academia, Praha.
- Hughes CR, Queller DC (1993): Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with allozyme polymorphism. *Molecular Ecology* 2, 131-137.
- Humple DL (2009): Genetic structure and demographic impacts of oil spills in western and Clark's grebes. Diplomová práce, Depon. in: Sonoma State University, Rohnert Park.

- Chang Q, FH Cao, LF Zhu, BW Zhang, KY Zhou (2005): Microsatellite variation and genetic diversity in the black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* in the lower reaches of Yangtze River. *Acta Zoologica Sinica* 4, 657-663.
- 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.
- Chapuis MP, Estoup A (2007): Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621-631.
- Christiakov DA, Hellemans B, Volchaert FAM (2006): Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 225, 1-29.
- Ismail A, Rahman F, Kin DKS, Ramli MNH, Ngah M (2011): Current status of the Milky Stork captive breeding program in ZOO Negara and its importance to the stork population in Malaysia. *Tropical Natural History* 11, 75-80.
- Ismail A, Rahman F (2012): An urgent need for Milky Stork study in Malaysia. *Tropical Agricultural Science* 35, 407-412.
- Iqbal M, Hasudungan F (2008): Observation of Milky Stork *Mycteria cinerea* during 2001-2007 in South Sumatra province, Indonesia. *BringingASIA* 9, 97-99.
- Iqbal M, Mulyono H, Riwan A, Takari F (2012): An alarming decrease in the Milky Stork *Mycteria cinerea* population on the east coast of South Sumatra province, Indonesia. *BringingASIA* 18, 68-70.
- Ji YJ, Liou YD, Ding CQ, Zhang DX (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4, 615-617.
- Karaiskou N, Buggiotti L, Leder E, Primmer CR (2008): High degree of transferability of 86 newly developed Zebra Finch EST-Linked Microsatellite markers in 8 Bird Species. *Journal of Heredity* 6, 688-693.
- Konrádová D (2013): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce, Depon. in: Knihovna biologických oborů, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

- Kůs E, Pflieger V (2000): Svět vzácných zvířat na přelomu tisíciletí. Granit, s.r.o. Praha.
- Lei CZ, Fan GL, Zhang YD, Qiu RB, Chen H (2005): Genetic polymorphism in a cultured population of the crested ibis *Nipponia nippon*. *Acta Zoologica Sinica* 4, 650-656.
- Lewin B (2000): Genes VII. Oxford University Press. Oxford.
- Maak S, Neumann K, von Lengerken G, Gattermann R (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics* 31, 233.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- McGuire HL, Noor MAF (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes* 2, 170-172.
- McLennan A, Bates A, Turner P, White M (2013): Molecular Biology, fourth edition, Garland Science, New York and Abington.
- McMillan AM, Bagley MJ, Evers DC (2004): Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). *Molecular Ecology Notes* 4, 297-299.
- Oliviera EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294-307.
- Paulus KB, 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.
- Primmer CR, Moller AP, Ellegren H (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5, 365-378.
- Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merila J (2005): Factors affecting avian *cross-species* microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36, 348-360.

- Rosypal S (2006): Úvod do molekulární biologie, díl první, čtvrté (inovované) vydání, Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc., Brno.
- Sachs JL, Hughes CR (1999): Characterization of microsatellite loci for red-necked grebes *Podiceps grisegena*. *Molecular Ecology* 8, 687-688.
- Santos MS, Goncalves C, Barbosa MSR, Silva A, Chneider PC (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* - Threskiornithidae - Aves). *Molecular Ecology Notes* 6, 307-309.
- Sawyer GM, Benjamin RC (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes* 6, 677-679.
- Seutin G, White BN, Boag PT (1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69, 82-90.
- Schlötterer C (1998): Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? *Current Biology* 8, 132-134.
- Shephard JM, 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.
- Snustad DP, Simmons MJ (2012): Genetics. Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc., Singapore.
- Stai SM, Hedges CR (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics* 34, 387-389.
- Svensson L, Grant PJ (2004): Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého východu. Svojtka & Co., Praha.
- Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koplíková J (2005): Metody molekulární biologie. Vydavatelství MU, Brno.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros, Praha.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (2006): Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice 2001-2003. Aventinum, Praha.

- Tomasulo-Seccomandi AM, Schable NA, Bryan AL Jr, Brisbin IL, del Lama SN, Glenn TC (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3, 563-566.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- Volf J, Filex J (1997): Ještě žijí.... Academia, Praha.
- Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* 14, 2807-2812.
- Wang H, Lou X, Zhu Q, Huang Y, Zhou L, Zhang B (2011): Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science* 8, 606-608.
- Watson DJ, Baker TA, Bell SP, Gann A, Losick R (2008): Molecular Biology of the Gene, Sixth edition. Pearson International Education/ Personal Education, Inc., San Francisco.
- Winkler KA, Weiss S (2008): Eighteen new tetranucleotide microsatellite DNA markers for *Coregonus lavaretus* cloned from an alpine lake population. *Molecular Ecology Resources* 8, 1055-1058.
- Yeung CKL, Hsu YC, Yao YT, Li SH (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, Patarnello 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.