

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2010**

**Ivana Horáková**

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



**Analýza polymorfních *cross-species*  
mikrosatelitů pro determinaci paternity  
u ibise hagedaše (*Bostrychia hagedash*)**

**Bakalářská práce**

**Ivana Horáková**

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 bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 9. 8. 2010

.....

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho odborné rady, poskytnuté materiály a jeho čas, který mi věnoval při vypracování této bakalářské práce. Dále mé poděkování patří kolegyním z Laboratoře populační genetiky za jejich cenné rady a pomoc.

## SOUHRN

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů, které by se bylo možno použít pro analýzu paternity ibise hagedaše (*Bostrychia hagedash*) a také řešení literární problematiky, jak u řádu brodiví, tak i konkrétně u ibise hagedaše.

Pro hledání mikrosatelitových markerů jsem použila metodu *cross-species* PCR amplifikace za využití celkem 340 párů primerů. Vzniklé amplikony jsem následně separovala v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek pomocí elektroforézy. Vzniklé produkty separace jsem vizualizovala roztokem AgNO<sub>3</sub>.

Páry primerů, které jsem testovala, byly izolovány z druhů ptáků z řádů brodiví (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), pelikáni (Pelicaniformes) a jiných. U zjištěných polymorfních mikrosatelitových lokusů jsem následně optimalizovala teplotu *annealingu* polymerázové řetězové reakce a čas elektroforetického dělení. Výsledkem mé práce bylo nalezení 38 polymorfních mikrosatelitových lokusů, u nichž jsem zjistila počet alel (počet alel se pohyboval od 2 do 4 alel na lokus) a heterozygotnost.

Nejúspěšnější *cross-species* amplifikace jsem zaznamenala u primerů odvozených z DNA ptáků z řádu brodiví (Ciconiiformes).

## SUMMARY

My bachelor thesis is focused on searching for polymorphic microsatellite loci, which would be used for paternity analysis hadada ibis (*Bostrychia hagedash*) and also address literary issues, as the order Ciconiiformes, and specifically in hadada ibis.

To search for microsatellite markers was used method of cross-species PCR amplification using a total of 340 pairs of primers. I subsequently incurred by separating amplicons in 6% polyacrylamide gel using electrophoresis. Products resulting from the separation I visualized AgNO<sub>3</sub> solution.

Primer pairs, which I tested, were isolated from birds of the order Ciconiiformes (Ciconiiformes), flamingos (Phoenicopteriformes), pelicans (Pelicaniformes) and others. The detected polymorphic microsatellite loci, I subsequently optimized annealing temperature of the polymerase chain reaction and electrophoretic separation time. The result of my work was to identify polymorphic microsatellite loci in 38, where I found the number of alleles (number of alleles ranged 2 to 4 alleles per locus) and heterozygosity.

The most successful cross-species amplification with primers I've seen from DNA derived from the order Ciconiiformes birds.

## OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>10</b>
3.1 Řád brodiví (Ciconiiformes).....	10
3.1.1 Čeleď volavkovití (Adeidae) .....	11
3.1.2 Čeleď čápoovití (Ciconiidae).....	13
3.1.3 Čeleď ibisovití (Threskiornithidae) .....	13
3.1.3.1 Ibis hagedaš ( <i>Bostrychia hagedash</i> ) .....	15
3.1.4 Zařazení ibise hagedaše do systému .....	16
3.2 Repetitivní DNA .....	17
3.2.1 Mikrosatelitní DNA .....	17
3.2.2 Analýza mikrosatelitů .....	20
3.2.2.1 Polymerázová řetězová reakce.....	20
3.2.2.2 Elektroforetická separace nukleových kyselin .....	21
3.2.3 <i>Cross-species</i> PCR amplifikace u ptáků .....	21
3.2.4 Využití mikrosatelitů u řádu brodiví (Ciconiiformes) a hledání mikrosatelitů <i>de novo</i> .....	22
<b>4 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>24</b>
4.1 Biologický materiál.....	24
4.2 Izolace genomické DNA z krve ptáků .....	24
4.3 Vyhledávání vhodných mikrosatelitových markerů pro ibise hagedaše pomocí metody <i>cross-species</i> PCR amplifikace .....	25
4.3.1 PCR amplifikace DNA .....	28
4.3.2 Zpracování PCR produktů .....	29
4.4 Seznam použitých chemikálií .....	31
4.5 Seznam použitých roztoků.....	32
4.6 Seznam použitých laboratorních přístrojů .....	34
<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>36</b>
<b>6 DISKUZE</b> .....	<b>43</b>
<b>7 ZÁVĚR</b> .....	<b>51</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>52</b>
<b>9 POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>53</b>

## 1 ÚVOD

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující repetitivní sekvence DNA s délkou motivu 1 - 6 párů bází. Vyskytují se v genomech všech eukaryotních organismů. Jedná se o vysoce polymorfní oblasti DNA, díky čemuž jsou velmi dobrými genetickými markery. Uplatňují se zejména při analýze paternity, při zkoumání fylogenetické příbuznosti organismů či pro získávání informací o genetické struktuře populací. Výhodou využívání mikrosatelitů je již zmíněný vysoký stupeň polymorfismu a také relativně snadná identifikace jednotlivých alel. Nevýhodou je nutnost izolace *de novo* u nově zkoumaných druhů.

U ptáků je většina známých mikrosatelitů odvozena zejména od druhů z řádu pěvců (Passeriformes). V rámci řádu brodiví (Ciconiiformes) byly nalezeny mikrosatelity zatím u 9 ze 113 druhů.

V následující práci budu pro hledání polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u ibise hagedaše (*Bostrichia hagedash*) používat primery získané pro amplifikaci DNA ptáků z řádů brodiví (Ciconiiformes), dlouhokřídlí (Charadriiformes), potáplice (Gaviiformes), potápky (Podicipediformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), tučňáci (Sphenisciformes), veslonozí (Pelecaniformes), vrubozubí (Anseriformes), a z jednoho druhu z řádu sudokopytníci (Artiodactyla).



## 2 CÍLE PRÁCE

1. Shromáždit dostupné literární zdroje a vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
2. Provést PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů s využitím *cross-species* primerů, které jsou známé od taxonomicky příbuzných či nepříbuzných druhů ptáků, za účelem zjištění jejich polymorfismu u ibise hagedaše (*Bostrychia hagedash*).
3. U zjištěných polymorfních mikrosatelitů provést optimalizaci parametrů PCR amplifikace a času separace PCR produktů v denaturujícím 6% polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Řád brodiví (Ciconiiformes)

Dosud bylo popsáno 113 recentních druhů ptáků z pěti čeledí: čápovití (Ciconiidae), člunozobcovití (Balaeniciptidae), ibisovití (Threskiornithidae) kladivoušovití (Scopidae) a volavkovití (Ardeidae) (Bejček *et* Šťastný, 1999). Do čeledi volavkovitých zařazují autoři Bejček *et* Šťastný (1999) 60 druhů, mezi kladivoušovité patří jenom jeden druh, a to kladivouš africký (*Scopus umbretta*), rovněž čeleď člunozobcovití zahrnuje pouze jeden druh, je jím člunozubec africký (*Balaeniceps rex*). Do čeledi čápovitých spadá 19 druhů a mezi ibisovité zahrnují až 32 druhů. Gaisler *et* Zima (2007) rozdělují brodivé na tři čeledi: čápovité, ibisovité a volavkovité, dále uvádějí, že u řádu brodiví se nejedná o monofyletický taxon.

Do řádu brodivých patří velcí až středně velcí ptáci s poměrně jednotným vzhledem v rámci celé skupiny. Tvar těla umožňuje získat potravu z vody či bažinatých biotopů. Většina zástupců má výrazný dlouhý zobák, dlouhý krk a dlouhé nohy. Tvar a velikost zobáku je projevem přizpůsobení k lovu potravy (Veselovský *et al.*, 2001). I ptáci, kteří si jsou navzájem velmi příbuzní, mohou mít zcela rozdílné typy zobáků (Veselovský *et al.*, 2001). U volavek nacházíme rovné ostré zobáky s výjimkou volavčíka člunozubého (*Cochlearius cochlearius*), ten má široký člunovitý zobák. Čápi mají také rovné zobáky (Veselovský *et al.*, 2001). Čápům příbuzná čeleď ibisovitých má dlouhé zahnuté či rovné vpředu zploštělé zobáky. Nohy jsou značně protáhlé, zvláště v běháku a bérce (Hudec *et al.*, 1994). Většina zástupců má krátkou blánu mezi vnějším a středním prstem, což jim umožňuje brodit se v mělkých vodách či bahnitých půdách. Přestože brodiví mají dlouhé nohy, nepoužívají je k běhu, pohybují se vždy pomalým krokem, jakmile prchají, vzlétnou (Hudec *et al.*, 1994). Postrádají přítomnost volete, jejich žaludek je třídílný, slepá střeva bývají zakrnělá (u volavek bývá vyvinuto pouze jedno), u samců se může vyskytovat rudimentární penis (Gaisler *et* Zima, 2007). Hlasové ústrojí (syrinx) je u brodivých většinou v různé míře zakrnělé, postrádá často hlasových svalů a někdy i hlasových bubínků – proto zejména mnozí čápovití jsou němí a nedostatek hlasu nahrazují vydáváním mechanických zvuků, např. klapáním zobáků (Hudec *et al.*, 1994). Pouze volavkovití mají výraznější hlasové projevy, což je zapříčiněno přítomností svalů zpevňujících syrinx.

Výborně létají, hlavně plachtí za využití vzdušných proudů vznikajících oteplováním vzduchu nad pevninou (statické plachtění). Loví různou živočišnou

potravu (Gaisler *et Zima*, 2007), většinou jsou masožraví a orientovaní na vodní živočichy od hmyzu po ryby a jiné obratlovce (Bejček *et Šťastný*, 1999), výjimečně jsou mrchožraví (Gaisler *et Zima*, 2007).

Obývají praktický celý svět až na nejchladnější a nejsušší místa (Bejček *et Šťastný*, 1999). Většinou jsou obyvateli vnitrozemských vod. Hnízda staví obvykle na stromech nebo v rákosinách, jednotlivě nebo v koloniích (Gaisler *et Zima*, 2007). Hnízda jsou poměrně velká stavěná z větví a klacků. Vejce jsou skoro u všech druhů neskvrnitá (Hudec *et al.*, 1994). O narozená mláďata se starají oba rodiče. Brodiví žijí většinou v monogamii.

Na základě stupně závislosti mláďete na rodičích rozeznáváme dvě skupiny mláďat, a to mláďata nidifugní (nekrmivá) a nidikolní (krmivá). Mláďata zástupců řádu brodivých patří mezi nidikolní, to znamená, že se líhnou neschopná samostatného života. Líhnou se na nízkém stupni zárodečného vývoje, jsou však vidoucí a vyznačují se rychlým růstem. Jsou neopeřená nebo jen z části opeřená, mají nadměrně vyvinutou trávicí soustavu, ale nedostatečně vyvinutou nervovou soustavu, smyslové orgány a orgány pohybu, rovněž jejich termoregulace dosud není účinná (Gaisler *et Zima*, 2007). Rodiče je proto zahřívají a krmí, jedná se tedy o mláďata krmivá. Potrava je podávána tak, že je vyvrhována do hnízda, u volavek zprvu přímo do zobáků. Mláďata mnoha druhů, zvláště těch, které hnízdí v rákosinách a v hustém větroví, opouštějí hnízdo dlouho před dosažením vzletnosti (Hudec *et al.*, 1994).

Zástupci čápů a volavek patří mezi ptáky tažné, kteří konají dvakrát do roka dlouhé přelety mezi místem svého hnízdění a místem zimování. Mezi naše tažné ptáky řadíme například čápa bílého a černého. Odrostlá mláďata volavek vykonávají tzv. předodletové potulky, které se částečně podobají letům přelétavých ptáků. Tyto potulky ale mohou přejít v pravý tah.

Hudec *et al.* (1994) řád brodivých přiřazuje, z fylogenetického hlediska, jak k řádu veslonohých (Pelecaniformes), tak k řádu dravců (Accipitriformes). Zřetelněji jsou však příbuzní s plameňáky.

### **3.1.1 Čeleď volavkovití (Ardeidae)**

Do této čeledi podle Gaisler *et Zima* (2007) patří celkem 65 druhů, z toho 4 pravidelně a 2 občas hnízdí i u nás. Bejček *et Šťastný* (1999) však do této čeledi zařazují 60 druhů. Mezi druhy hnízdící u nás řadíme volavku popelavou (*Ardea*

*cinerea*) – vyskytuje se na několika místech ČR a hnízdí zejména na stromech či v blízkosti vodních nádrží, kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) – hnízdí v koloniích například v jižních Čechách nebo v zámeckém parku Lednice na Moravě (Gaisler *et* Zima, 2007). Dále také volavku rusohlavou (*Bubulcus ibis*) – vyskytuje se hlavně v jižní Evropě, ale občas zalétá i do ČR a bukáčka malého (*Ixobrychus minutus*) – u nás se vyskytuje již velmi vzácně v hustých rákosovitých porostech, hnízdí od Evropy po Austrálii (Gaisler *et* Zima, 2007).

Jedná se o štíhlé ptáky s úzkým klínovitým zobákem. Dlouhý krk za letu esovitě skládají (Bejček *et* Šťastný, 1999). Esovité ohnutí krku umožňuje 6. obratel, který je značně prodloužený. Peří ošetřují pomocí drobného prachu, který se odlamuje z pernic na prsou a na kostrči (Bejček *et* Šťastný, 1999). U některých se vyskytují chocholky, u jiných se ve svatebním šatě objevují na různých místech těla ozdobná pera (Hudec *et al.*, 1994). Před špičkou klínovitého či špičatého zobáku se nacházejí jemné zoubky. Kořisti se zmocňují jak v mělčinách, tak i na souši. Lovící volavky trpělivě vyčkávají na místě nebo pomalu kráčí, přičemž mají dozadu prohnutý krk a dopředu směřující ostrý zobák (Bejček *et* Šťastný, 1999), který do vody zanořují velmi rychlým harpunovacím způsobem. Potravou jim jsou obojživelníci a jejich larvy, korýši, hmyz, ryby, hadi, drobní ptáci či savci.

Hnízdí většinou koloniálně na stromech nebo v mokřadních bylinných porostech (Bejček *et* Šťastný, 1999). U volavek, také u dravců či sov, se vyskytuje známý jev zvaný asynchronní inkubace vajec. Tímto jevem se někteří ptáci přizpůsobili nepředvídatelným podmínkám prostředí při rozmnožování (Veselovský *et al.*, 2001). Asynchronní inkubace se uplatňuje již od prvního sneseného vejce a zabraňuje tak případnému uhynutí mlád'at při zhoršených podmínkách. Jedná se o typ inkubace vajec, při němž se mlád'ata ve snůšce nelíhnou zároveň, tudíž se mlád'ata líhnou různě stará. To může mít za následek znevýhodnění později vylíhnutých jedinců oproti těm, jež se líhnou dříve.

Největší volavkou je volavka obrovská (*Ardea goliath*). Rozpětí křídel dosahuje 210 až 230 cm, dlouhá je asi 140 cm. Vyskytuje se v Africe na jih od Sahary. Mezi další zástupce řadí např. volavku červenou (*Ardea purpurea*), volavku bílou (*Egretta alba*), volavku tříbarvou (*Egretta trikolour*), volavku stříbřitou (*Egretta garzetta*), volavku vlasatou (*Ardeola ralloides*) aj.

### 3.1.2 Čeleď čápoovití (Ciconiidae)

Čápoovití jsou velcí ptáci, kteří za aktivního letu či plachtění natahují svůj dlouhý krk daleko dopředu (Bejček *et* Šťastný, 1999). Mají velký klínovitý zobák, zakrnělé hlasové ústrojí bez hlasových svalů. Akusticky se projevují pouze klapáním zobáku. Jejich vysoké nohy jsou více než do poloviny bérce neopeřené a mají poměrně slabě vyvinutý palec (Hudec *et al.*, 1994). Čápoovití mají rudimentární penis i slepá střeva. Létají s nataženým krkem (Hudec *et al.*, 1994).

Způsob lovu je sběr potravy v mělkých vodách nebo na suchu, potrava bývá velmi rozmanitá. Hnízdí jednotlivě i v koloniích (Bejček *et* Šťastný, 1999). Čápi používají své hnízdo několik let až několik generací (Veselovský *et al.*, 2001).

Čeleď čápoovitých zahrnuje 19 druhů, které jsou rozšířené především v tropických oblastech. Dva z těchto druhů hnízdí i u nás, a to čáp bílý (*Ciconia ciconia*) a čáp černý (*Ciconia nigra*). Čáp bílý na rozdíl od černého hnízdí na stromech i budovách, v západní a severní Evropě je vážně ohrožen (Gaisler *et* Zima, 2007), i v ČR počet hnízdících párů výrazně poklesl, nyní je však situace stabilní. Početnost čápa černého se u nás naopak zvýšila.

Mezi významné zástupce patří například čáp východní (*Ciconia boyciana*), čáp černokrký (*Ephippiorhynchus asiaticus*), čáp simbil (*Ciconia abdimii*), marabu africký (*Leptoptilos crumeniferus*), který se dožívá až 14 let a na rozdíl od většiny čápoovitých nemá při letu natažený krk.

### 3.1.3 Čeleď ibisovití (Threskiornithidae)

Jsou to středně velcí ptáci hnízdící v koloniích (Gaisler *et* Zima, 2007). Mezi ibisovité řadí 32 druhů, většinou rozšířených v tropických oblastech. Obývají všechny světadíly s výjimkou Antarktidy (Bejček *et* Šťastný, 1999). Například ibise bělolícího (*Plegadis chihi*) můžeme nalézt od severní hranice USA až po Mexický záliv, ibise hnědého (*Plegadis falcinellus*), který se vyskytuje v tropech a subtropích Ameriky, Eurasie i Afriky. Dle Hudece *et al.* (1994) se do této čeledi řadí 34 druhů žijících v tropech celého světa, 7 druhů z 5 rodů se vyskytujících v palearktické oblasti a 2 druhy ze 2 rodů nacházejících se v ČR. Veselovský *et al.* (2001) uvádějí, že na základě studia třetíhorních ibisů (Threskiornithidae) bylo zjištěno, že ibisi jsou mnohem příbuznější bahňáků než čápům.

Ibisovití se v ČR a SR vyskytují zejména v zoologických zahradách, jsou to ZOO Bojnice, Bratislava, Brno, Dvůr Králové, Chomutov, Liberec, Ohrada, Ostrava, Praha, Plzeň a Zlín – Lešná (Hofrichterová, 2008).

Hlavními stanovišti ibisů jsou rozsáhlé a různě členité mokřady, jen některé druhy obývají suchá bezlesá území. Jejich potravou jsou především koryši, měkkýši, hmyz a jiní bezobratlí, menší obratlovci a někdy i mršiny (Šťastný *et al.*, 1998).

Čeď ibisovití zahrnuje druhy s hustým opeřením, někdy na hlavě, krku a kostrči značně prodlouženým (Hudec *et al.*, 1994). Prachové peří narůstá ibisovitým po celém těle na rozdíl od jim příbuzné čeledi čápovitých, jimž prachové peří roste rozptýleně po těle. Mláďata, stejně jako mláďata čápovitých, se rodí s dvojitým prachovým šatem (Hudec *et al.*, 1994). Křídla jsou široká a dlouhá, ocas krátký (Šťastný *et al.*, 1998). Na hlavě mívají kožovité záhyby či holá místa, někdy krytá prodlouženými pery. Obě pohlaví jsou stejně zbarvená, samci oproti samicím bývají větší, mladí ptáci jsou vybaveni matnějším peřím. Za letu mají nohy i krk natažené, samotný let je velmi rychlý. Ibisí z čeledi Threskiornithidae mají zobáky tenké, dlouhé a srpovitě zahnuté, kolpíkům z rodu *Platalea* se konec zobáku rozšiřuje v rohovitou lžičku, pomocí které vybírají potravu z bahna.

Čeď ibisovitých je rozdělena na podčeď ibisů a podčeď kolpíků. Mezi významné zástupce ibisů patří například ibis posvátný (*Threskiornis aethiopicus*), který se vyskytuje v tropické Africe, podobně jako bájný fénix (volavka) byl nábožensky uctívaným ptákem ve starověkém Egyptě, žije především v bažinatém prostředí, také ibis obrovský (*Pseudibis gigantea*), u něj není vyloučeno, že vyhynul, poslední hnízdiště leželo v Dong Tham Muoi (Šťastný *et al.*, 1998). Dále ibis skalní (*Geronticus eremita*), hnízdí především na skalách v suchých, bezlesých oblastech severozápadní Afriky i Malé Asie, přežívá pouze 700 zástupců tohoto druhu, a to v zajetí, aj.

Kolpíci jsou poměrně velcí ptáci, kůže na bradě a kolem očí je lysá. Přední prsty asi do 1/3 spojeny plovací blánou (Hudec *et al.*, 1994). Do podčeledi kolpíků patří kolpík bílý (*Platalea leucordia*), který hnízdí na jihu Evropy, v Asii a na severu Afriky (Bejček *et Šťastný*, 1999). Dalším zástupcem je kolpík africký (*Platalea alba*), vyskytuje se zejména v mělkých vodách ve vnitrozemí Afriky. Je celý bílý, jen nohy a přední holou část hlavy má červené (Bejček *et Šťastný*, 1999). Kolpík růžový (*Platalea ajaja*) je jediný druh kolpíka s růžovým opeřením, stanovištěm tohoto ptáka jsou slané a brakické mokřady poblíž mořského pobřeží.

### 3.1.3.1 Ibis hagedaš (*Bostrychia hagedash*)

Ibis hagedaš obývá sušší oblasti včetně kulturních krajín, lze ho spatřit i v městských parcích nebo na hřbitovech. Vyhledává travinné porosty i v tropických či subtropických oblastech, zvláště podél vodních toků, které lemují stromy (Bejček *et* Šťastný, 1999). Méně často osidluje močály, zatopené bažiny či mangrovové mokřady. Je rozšířen v oblasti kontinentální Afriky na jih od Sahary.

V jižní Africe po snížení počtu jedinců na přelomu století se opětovně rozšířil, zejména díky zavedení pastvy dobytka, která souvisí se zvýšením počtu koprofágního hmyzu jako velmi důležitého potravního zdroje (Šťastný *et al.*, 1998). K prvotnímu snížení počtu došlo v důsledku lovu během koloniální expanze, kdy byl tento druh loven a prodáván v Nigérii. Dožívá se patnácti až dvaceti let, hmotnost těla je asi 1,3 kg, dorůstá délky 46 – 102 cm. Rozpětí křídel může být mezi 90 až 97 centimetry. Ibisi se živí hmyzem, koryši, žábami, červy či drobnými plazy.

Stromová hnízda si staví z klacíků na vodorovných větvích, obvykle 3 až 6 metrů nad zemí. Někdy si postaví hnízda i na telegrafních sloupech (Šťastný *et al.*, 1998). Snáší 2 - 3 vejce, výjimečně 4, doba inkubace činí 25 až 28 dní (celoročně, v závislosti na období dešťů). Hnízda využívá zpravidla rok co rok, ovšem ne nutně stejný pár. Rodiče svá mláďata krmí do doby vzletnosti, po dobu asi sedmi týdnů.

Při odletu či přiletu na nocoviště, nebo při vyplašení vydává ibis hagedaš nepříjemné skřeky. Nocují ve společnosti asi 200 jiných ptáků, mezi něž řadíme například kormorány nebo volavky.

Barva peří je tmavě hnědá, zejména na hřbetě a svrchních stranách křídel se objevují zelené až modrozelené odlesky (viz Obrázek 1). Nohy jsou černé, stejně jako dlouhý zobák, který má navíc výrazný červený pruh na horní čelisti. V letu typicky mění rychlé a volné rázy křídel (Šťastný *et al.*, 1998).

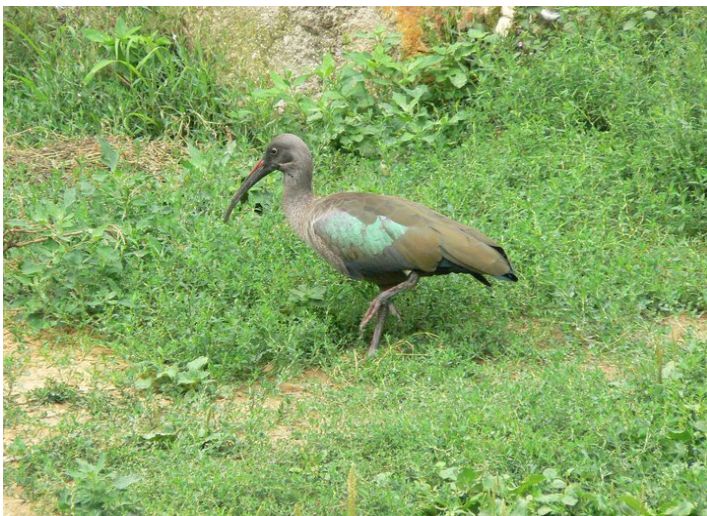
Ibise hagedaše v České republice žije pouze v zajetí zoologických zahrad, a to ZOO Dvůr Králové, ZOO Liberec a ZOO Praha. V ZOO Dvůr Králové byli v roce 2008 chováni celkem tři samci, pět samic a dvě mláďata ibise hagedaše. V Liberecké zoologické zahradě byl ke stejnému roku evidován jeden samec a v ZOO Praha to byl pak jeden chovný pár.

Ibis hagedaš je zapsán v Červené knize ohrožených zvířat IUCN (The IUCN Red list of Threatened species). Mezinárodní svaz ochrany přírody (IUCN) řadí ibise hagedaše mezi méně ohrožené druhy, kvůli větší velikosti celkové populace, která

nedosahuje prahových hodnot nutných pro zařazení do skupiny kriticky ohrožených zvířat (prahová hodnota je < 10 000 dospělých jedinců s 10% poklesem populace v průběhu deseti let nebo tří generací). Druh je ohrožen hlavně v období sucha, kdy dochází ke snížení dostupnosti potravy (Anonymous, 2009; www.iucnredlist.org).

### 3.1.4 Zařazení ibise hagedaše do systému

- **Říše** Animalia
  - **Podříše** Eumetazoa
  - **Oddělení** Bilateria
  - **Kmen** Chordata
  - **Podkmen** Vertebrata
  - **Nadtřída** Tetrapoda
  - **Třída** Aves
  - **Podtřída** Ornithurae
  - **Nadřád** Neognathae
  - **Řád** Ciconiiformes
  - **Čeleď** Threskiornithidae
  - **Rod** *Bostrychia*
  - **Druh** *Bostrychia hagedash*
- (Anonymous, 2010, www.biolib.cz)



**Obrázek 1:** Ibis hagedaš (*Bostrychia hagedash*)

Foto [http://kisspanda.rajce.idnes.cz/ZOO\\_Praha\\_15.7.2008/](http://kisspanda.rajce.idnes.cz/ZOO_Praha_15.7.2008/)



## 3.2 Repetitivní DNA

Repetitivní DNA jsou nukleotidové sekvence, které se v genomu nachází v mnoha kopiích. Lze je rozdělit na tandemově se opakující repetitivní DNA a na rozptýlenou repetitivní DNA.

Tandemově repetitivní DNA se v savčím genomu vyskytuje z 10 až 15 %, kdy délka opakované jednotky činí až deset párů bází. Jedná se tedy o krátké sekvence, jež jsou opakovány v mnoha kopiích. Nukleotidové složení tandemově repetitivní DNA je často dostatečně odlišné od zbytku buněčné DNA, repetitivní DNA má vnitřně odlišenou hustotu, čehož využívají zejména badatelé, kteří ji izolují diferenční ultracentrifugací (Cambel *et* Reece, 2006). Tandemově repetitivní DNA se vyskytuje v rozpětí přes 100 000 párů bází (Cambel *et* Reece, 2006). Satelitní DNA rozdělujeme na dvě kategorie, na minisatelitní DNA, jejíž délka repetitivního úseku se vyskytuje v rozpětí 100 - 100 000 bp, a na mikrosatelitní DNA, která se vyskytuje v ještě kratších úsecích 10 - 100 bp. Výskyt běžné satelitní DNA je z větší části na chromozomových telomerech nebo centromerech.

Rozptýlená repetitivní DNA se u eukaryotních organismů nachází roztroušeně po celém genomu, jednotky tedy nejsou umístěny jedna za druhou jako je tomu u tandemové repetitivní DNA. Délka opakované jednotky je 100 až 10 000 párů bází a počet takových jednotek v jednom genomu je 10 - 1 milion. Tyto jednotky jsou si navzájem velmi podobné, avšak nejedná se o identické sekvence. U lidí a primátů pochází tyto repetice z rodiny, která se nazývá *Alu* element. Úsek těchto elementů je dlouhý kolem 300 nukleotidových párů. Mnohé *Alu* elementy jsou přepisovány do RNA molekul; jejich buněčná funkce, je-li nějaká, je neznámá (Cambel *et* Reece, 2006). Tyto repetitivní sekvence jsou s největší pravděpodobností transpozony, pohyblivé genetické elementy.

### 3.2.1 Mikrosatelitní DNA

Jako mikrosatelity se označují krátké, tandemově se opakující jednoduché sekvenční motivy zpravidla o 2 - 6 bp, vyskytují se ve všech dosud zkoumaných prokaryotických a eukaryotických genomech a to jak v kódujících, tak i nekódujících oblastech (Zima *et al.*, 2004). V nekódujících oblastech se nachází díky vysoké míře mutací, nahromadění takových mutací může nakonec inhibovat amplifikaci v jednom

druhu s primery původně navrženými od druhů evolučně vzdálenějších (Primmer *et al.*, 1996). Mikrosatelity bývají také někdy označovány jako STR – short tandem repeat (krátké tandemové repetice) nebo i SSR – simple sequences repeat (repetice jednoduchých sekvencí).

Nejčastější mikrosatelitní sekvencí, která se v genomu člověka (podobně i u bakterií) vyskytuje, je poly (A) či poly (T). Tyto sekvence se ale v oblasti populačních studií nevyužívají pro svou značnou nestabilitu v průběhu PCR reakce. Z „typických“ mikrosatelitů jsou nejfrekventovanější dinukleotidové motivy, následované tri - a tetranukleotidovými sekvencemi (Zima *et al.*, 2004). Nejčastější sekvence u savců jsou  $(TG)_n/(AC)_n$ . Tato opakování se vyskytují až dvakrát častěji než repetice AT a dokonce až třikrát častěji než AG. Mezi trinukleotidy jsou nejfrekventovanější CAG a AAT.

Mikrosatelity jsou vysoce variabilní a somaticky stabilní, díky čemuž jsou často využívány jako molekulární markery. Za hlavní zdroj vysoké proměnlivosti je považováno sklouznutí nukleotidového řetězce během replikace (Zima *et al.*, 2004). Díky tomuto jevu se jednotlivé alely liší navzájem svojí délkou a mohou tak být rozdělovány pomocí elektroforézy.

Mikrosatelity jsou díky jejich vysokému stupni početnosti a celogenomové distribuci využívány jako významné genetické markery zejména při mapování genomu, jejich vysoká proměnlivost a vzájemná kodominance jednotlivých alel z nich činí nástroj forezních analýz, individuálního typování jedinců v populaci, určování paternity, velikosti a struktury populace, genetické proměnlivosti, toku genů, v ochraně druhů atd. (Zima *et al.*, 2004). Avšak ani predispozice v podobě vysokého polymorfismu u určitého druhu nezaručuje, že stejný polymorfismus bude nalezen u příbuzných druhů zejména při zvyšování evoluční vzdálenosti (Rubinsztein *et al.*, 1995; Morison *et al.*, 1998; Zane *et al.*, 2002). U ptáků, stejně tak i u dobytka, se potvrdila 50% úspěšnost použití *cross-species* amplifikace a detekce polymorfismu, což potvrdilo, že je *cross-species* amplifikace úspěšná u velmi příbuzných taxonů, jako jsou například druhy patřící do stejného rodu (Zane *et al.*, 2002). Avšak dle Barbara *et al.* (2007) je schopnost přenosu u *cross-species* mikrosatelitových lokusů v rámci taxonů velmi nevyrovnaná, což snižuje univerzálnost mikrosatelitů jako genetických markerů. Nejvyšší potenciál pro přenos *cross-species* mikrosatelitových lokusů je u druhů s největšími generačními časy a u druhů, kde se velikost genomu liší u cílových organismů v porovnání s genomy zdrojových organismů (Barbara *et al.*, 2007).

Za hlavní nevýhodu mikrosatelitů lze označit nutnost izolace *de novo* pro druhy, které jsou zkoumány poprvé. A to hlavně díky tomu, že se většina mikrosatelitů nachází v nekódujících oblastech genomu, jež charakterizuje vysoká frekvence nukleotidových substitucí. Z toho důvodu je navrhování „univerzálního primeru“ odpovídajících sekvencí účinných pro mitochondriální DNA obtížné (Zane *et al.*, 2002). U intenzivně studovaných organismů (člověk, myš, octomilka aj.) je známa celá řada mikrosatelitů, které lze použít i na příbuzné druhy (Zima *et al.*, 2004).

Mikrosatelity jsou využívány především jako genetické markery, dále také jako kódující a regulační elementy vyskytující se v oblasti promotoru, kde slouží jako zesilovače, avšak v případě delece oblasti mikrosatelitu dochází k zeslabení jeho aktivity. Některé mikrosatelity mohou také vázat řadu specifických regulačních proteinů (Zima *et al.*, 2004). S touto funkcí byly nalezeny u řady regulačních proteinů, jejich proměnlivost v počtu repetice mívá hlavně funkční následky. Recentní studie prokazují fenotypové účinky změn délky mikrosatelitových repeticí na fyziologii a ontogenetický vývoj na úrovni organismu (Zima *et al.*, 2004). Zmnožení repeticí zapříčiňuje vznik některých závažných poruch, například u genu *Sry*, který je zodpovědný za determinaci pohlaví u myši domácí či zodpovědný za syndrom fragilního chromozomu X, jehož důsledkem bývá mentální retardace u lidí. Za syndrom fragilního X je zodpovědná první stanovená sekvence „tripleťových opakování“ (Cambel *et al.*, 2006). Také Huntingtonova choroba je zapříčiněná opakováním tripletů, a sice CAG (Cambel *et al.*, 2006). Stejně jako mikrosatelity, fenotyp organismu ovlivňují také minisatelity. Jejich vliv na organismus byl prokázán při výzkumu Exonu III genu *D4DR* (*D4 dopamine receptor gene*).

Izolace mikrosatelitových markerů se provádí mnoha způsoby. Původně se mikrosatelitové lokusy izolovaly z částečných genomových knihoven (selektované pro malé inzerty) daných druhů pomocí screeningu několika tisíc klonů prostřednictvím hybridizace se sondami. Tato metoda se ukázala jako příliš zdlouhavá, a proto se další metody snažily o úsporu času během izolace a o větší výnos. Aby se zabránilo konstrukci genomových knihoven a zdlouhavému screeningu došlo k navržení určitých změn náhodně amplifikované DNA (RAPD) za využití náhodných (random) primerů či RAPD primerů a za pomoci Southern hybridizace s mikrosatelitovými sondami (Zane *et al.*, 2002). Další z metod založených na PCR reakci využívá opakujících a ukotvujících se primerů. I když tyto metody šetří čas při sestavování genomových knihoven a jsou úspěšné, nejsou často využívány. Jiná skupina izolačních metod je založena na

selektivní hybridizaci (Zane *et al.*, 2002). Prvním krokem je fragmentace DNA, následována začleňováním vektorů či adaptorů. Délka DNA fragmentů nezávisí na nukleotidovém složení genomu, ale naopak vyžaduje vytvoření tupých konců u jednotlivých fragmentů (Zane *et al.*, 2002). Mezi nové metody patří tzv. FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences COntaining repeats) autorů Zane *et al.* (2002). Tato metoda je rychlá, jednoduchá a byla testována na různých organismech jako např. na ptácích (*Passera lagia*), rybách (*Sparus aurata* a *Lophius americanus*), korýších (*Meganyctiphanes norvegica*) a červených korálech (*Corallium rubrum*).

### 3.2.2 Analýza mikrosatelitů

Pokud známe sekvence používaných primerů, které jsou komplementární k okrajovým jedinečným sekvencím, ohraničujícím mikrosatelitový lokus, lze provést PCR reakci a následnou separaci PCR produktů v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu pomocí elektroforézy. U vícenukleotidových a málo proměnlivých mikrosatelitů může postačit kvalitní a relativně koncentrovaný agarózový gel a barvení ethidium bromidem, v případě dvounukleotidových a vysoce polymorfních mikrosatelitů je však nutno použít PAGE a barvit dusičnanem stříbrným, nebo Coomassie Blue (Zima *et al.*, 2004).

#### 3.2.2.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je cyklicky se opakující syntéza nových řetězců vybraných úseků dsDNA prostřednictvím DNA polymerázy. Daný úsek je vymezen dvojicí primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA. K samotné syntéze se využívá termostabilní polymeráza (např. *Taq* DNA polymeráza), která je vyizolovaná z termofilních mikroorganismů (Šmarda *et al.*, 2005).

PCR je proces, v němž se cyklicky opakují tři kroky, cyklů bývá nejčastěji 25 – 35, aby se dosáhlo dostatečné amplifikace. V prvním kroku dochází k denaturaci dvouřetězcových molekul DNA při teplotě 94 - 98 °C. Následuje zchlazení reakční směsi na 30 - 65 °C a dochází k hybridizaci primerů k odděleným řetězcům DNA. Třetím krokem je syntéza nových řetězců prostřednictvím DNA polymerázy, děje se tak při teplotě 65 - 75 °C. Nové řetězce se syntetizují ve směru od 3'-konce daného primerů k 5'-konci templátové DNA.

Reakce se provádějí v termocyklerech, dochází zde k automatickým změnám teploty, v závislosti na právě probíhajícím kroku daného programu. Opakováním jednotlivých kroků dochází k exponenciálnímu zvětšování počtu kopií vybraného úseku DNA.

### 3.2.2.2 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin (Šmarda *et al.*, 2005). Základním principem je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Separace se provádí ve vhodném nosiči, jímž obvykle bývá gel. Elektroforetické gely určené pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji polyakrylamidové nebo agarózové. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul o velikosti od 100 bp po 50 kb, polyakrylamidové gely se používají pro separaci menších molekul, o velikosti 10 až 1000 bp (Šmarda *et al.*, 2005).

Po dokončení elektroforézy je potřeba výsledný produkt vizualizovat. K vizualizaci molekul DNA se používá nejčastěji ethidium bromid nebo jiná fluorescenční barviva, či dusičnan stříbrný.

### 3.2.3 *Cross-species* PCR amplifikace u ptáků

Možnost provádět *cross-species* PCR amplifikaci u ptáků byla zjišťována pomocí analýzy sady primerů pocházejících z DNA vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) a lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) na 48 různých druzích ptáků. Bylo zaznamenáno 162 případů heterologní amplifikace, deset z výsledných amplifikačních produktů byly sekvence, které byly shledány homologními k původnímu lokusu (Primmer *et al.*, 1996). Stejní autoři poukazují na negativní vztah mezi genetickou vzdáleností a mírou polymorfismu. Polymorfismus se snižuje se zvyšující se genetickou vzdáleností, tudíž průměrná délka repetice u vysoce polymorfních mikrosatelitů klesá s rostoucí genetickou vzdáleností. Tento jev poukazuje na skutečnost, že krátké repetice jsou v průběhu evoluce zachovávány častěji než dlouhé repetice, což významně zvyšuje využitelnost mikrosatelitové *cross-species* PCR amplifikace při studiu fylogeneze a

určování jednotlivých druhů. Úspěšná *cross-species* heterologní amplifikace DNA je inverzním vztahem k evoluční vzdálenosti mezi dvěma druhy (Primmer *et al.*, 1996).

### 3.2.4 Využití mikrosatelitů u řádu brodiví (Ciconiiformes) a hledání mikrosatelitů *de novo*

Využití mikrosatelitů pro studium přírodních populací neustále narůstá (Primmer *et al.*, 1996). Pro řád brodivých byly mikrosatelity poprvé použity u dvou druhů kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a u nesyta lesního (*Mycteria americana*).

V rámci čeledi volavkovitých (Ardeidae) byly polymorfní mikrosatelity nalezeny u volavky velké (*Ardea herodias*), kde autoři McGuire *et* Noor (2001) získali 60 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Pro sedmnáct z nich byly navrženy příslušné primery, které byly testovány na volavce bílé (*Ardea alba*), popelavé (*Ardea cinerea*) a jihoamerické (*Ardea cocoi*). 15 lokusů bylo u volavky velké (*A. herodias*) polymorfních. Chang *et al.* (2009) získali 11 polymorfních mikrosatelitových markerů pro kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*). Získané polymorfní lokusy byly dále testovány na nepříbuzných jedincích druhů volavek a bukačů. Autoři Chang *et al.* (2005) ve svém článku uvádí použití primerů navržených pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených od volavky velké (*Ardea herodias*) u kvakoše nočního. Testovali osm mikrosatelitových lokusů (Ah 211, Ah 320, Ah 343, Ah 421, Ah 209, Ah 414, Ah 522 a Ah 526) na třech populacích nalézajících se v okolí řeky Yangtze. Dále byly popsány mikrosatelity u volavky žlutozubé (*Egretta eulophotes*) (Huang *et al.*, 2009). Izolováno bylo 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů z genomu daného druhu testováním celkem 20 jedinců pocházejících z provincie Fujian z Číny. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 9. Autory Hill *et* Green (2010) bylo izolováno 12 polymorfních mikrosatelitů z genomu volavky červenavé (*Egretta rufescens*) testováním 31 jedinců z kolonie nacházející se v Texasu. Počet alel na lokus je od 2 do 10.

Autoři Tomasulo - Seccomandi *et al.* (2003) vyizolovali 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů z DNA nesyta lesního (*Mycteria americana*) taxonomicky zařazeného do čeledi čápoovitých (Ciconiidae). Primery testovali na dvou populacích nesyta lesního z Brazílie a USA. Pro stejný druh byly již dříve autory Van Den Bussche *et al.* (1999) nalezeny 4 polymorfní mikrosatelitové lokusy. Lokusy byly izolovány ze

136 jedinců pocházejících z devíti kolonií. Shephard *et al.* (2009) analyzovali populaci čítající 30 jedinců čápa bílého (*Ciconia ciconia*) pocházející z Animal Wildlife Park z Belgie. Výsledkem bylo nalezení sedmi polymorfních mikrosatelitů s počtem alel v rozmezí 2 - 10 na lokus.

V čeledi ibisovitých (Threskiornithidae) bylo z genomu kriticky ohroženého ibise japonského (*Nipponia nippon*) autory Ji *et al.* (2004) získáno 8 polymorfních mikrosatelitových lokusů. *Cross-species* amplifikace těchto lokusů byla testována na třech příbuzných jedincích ibise černohlavého (*Threskiornis melanocephalus*). U ibise japonského (*Nipponia nippon*) bylo nalezeno He *et al.* (2005) 11 polymorfních mikrosatelitů. Nalezené lokusy byly testovány na 27 jedincích tohoto druhu žijících v zajetí a na 9 jedincích vyskytujících se volně. Počet alel na lokus se pohyboval v rozmezí od 2 do 5. Další 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů bylo nalezeno v genomu ibise rudého (*Eudocimus ruber*) a pro tyto lokusy byly dále navrženy primery. Testování probíhalo na 45 zástupcích tří brazilských populací tohoto druhu. Autoři také uvádí počet alel, který se pohyboval v rozmezí 3 - 17 alel na lokus (Santos *et al.*, 2005). Autoři Sawyer *et Benjamin* (2006) ve své práci našli šest polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených z DNA kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*). Pro testování bylo vybráno 61 jedinců ze tří zoologických zahrad a jedné přirozeně se vyskytující populace. Mikrosatelity obsahovaly průměrně šest alel na lokus. Yeung *et al.* (2008) vyizolovali 23 polymorfních mikrosatelitových lokusů získaných z genomu kolpíka malého (*Platalea minor*). Primery testovali na 20 jedincích kolpíka malého, počet alel na lokus byl v rozmezí od 2 do 8.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál byl získán ze ZOO Dvůr Králové. Vzorky krve byly odebrány jedincům vyskytujícím se v chovu ibise hagedaše veterinářem zoologické zahrady pomocí injekční stříkačky. Odebráno bylo malé množství krve (50 – 100  $\mu$ l) z tarzální žíly, krev byla dále uchovávána v 1 ml Queen's pufru (Seutin *et al.*, 1991).

### 4.2 Izolace genomické DNA z krve ptáků

Postup izolace dle Maniatis *et al.* (1982) byl upraven na základě vybavení Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty UP.

1. Do zkumavky se 100  $\mu$ l roztoku ptačí krve v Queen's pufru byla přidána proteináza K (100  $\mu$ l) a stejný objem 10% roztoku SDS. Směs byla ponechána k inkubaci v termostatu přes noc. Následně byl ke směsi přidán chloroform a fenol (300  $\mu$ l obého).
2. Zkumavky s roztoky byly zvortexovány a zcentrifugovány (5 minut). Poté byla ze zkumavek odebrána vrchní fáze, ke které bylo přidáno 700  $\mu$ l chloroformu a opět byl vzorek centrifugován (5 minut).
3. Po centrifugaci byla opětovně odstraněna svrchní fáze a byl přidán vychlazený octan sodný (180  $\mu$ l). Zbylý prostor zkumavky byl vyplněn vychlazeným izopropanolem. Celá směs byla uložena na 2 hodiny do -20 °C.
4. Po vychlazení byl ze směsi odlit izopropanol a k vytvořené sraženině DNA byl přidán vychlazený etanol. Následovala centrifugace (5 minut).
5. Poté byl etanol slit a zbytek směsi ve zkumavce byl vysušen v termobloku. K vysušené sraženině byl přidán TE pufr (500  $\mu$ l). Směs byla ponechána přes noc v termostatu k rozpouštění.



6. Po stanovení koncentrace DNA byl roztok zamražen při -20 °C a takto uchováván pro použití k PCR reakci.

#### 4.3 Vyhledávání vhodných mikrosatelitových markerů pro ibise hagedaše pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace

Při hledávání vhodných markerů pro ibise hagedaše metodou *cross-species* mikrosatelitové DNA jsem testovala jednotlivé páry primerů, které amplifikovaly polymorfní mikrosatelity u zástupců z řádů brodiví (Ciconiiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), potáplice (Gaviiformes), tučňáci (Sphenisciformes), veslonoží (Pelecaniformes), vrubozubí (Anseriformes) a u jednoho druhu z řádu sudokopytníci (Artiodactyla).

Podrobný přehled všech testovaných primerů společně s údaji o daném druhu, od kterého byly odvozeny, jejich zařazení do řádů jsou uvedeny v Tabulce 1.

**Tabulka 1:** Testované mikrosatelitové lokusy u ibise hagedaše (*Bostrychia hagedash*).

V tabulce je uveden zdrojový druh, jeho zařazení do řádu, dále testované mikrosatelitové lokusy a autoři těchto lokusů.

ŘÁD	ZDROJOVÝ DRUH	MIKROSATELITOVÝ LOKUS	AUTOR
<b><u>BRODIVÍ</u></b>	<b>Čáp bílý</b> ( <i>Ciconia ciconia</i> )	Cc01, Cc02, Cc03, Cc04, Cc05, Cc06, Cc07	(Shephard <i>et al.</i> , 2009)
		CC1, CC3, CC7, CC9, CC10, CC13	(Segelbacher, osobní sdělení)
	<b>Ibis japonský</b> ( <i>Nipponia nippon</i> )	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, Nn26	(He <i>et al.</i> , 2006)
	<b>Ibis rudý</b> ( <i>Eudocimus ruber</i> )	Eru02, Eru03, Eru04, Eru05, Eru06, Eru07, Eru08, Eru09, Eru10, Eru11	(Santos <i>et al.</i> , 2006)

<b><u>BRODIVÍ</u></b>	<b>Kolpík malý</b> ( <i>Platalea minor</i> )	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	(Yeung <i>et al.</i> , 2009)
	<b>Kolpík růžový</b> ( <i>Ajaia ajaja</i> )	Aaju1, Aaju2, Aaju3, Aaju4, Aaju5, Aaju6	(Sawyer <i>et Benjamin</i> , 2006)
	<b>Kvakoš noční</b> ( <i>Nycticorax nycticorax</i> )	nycti14, nycti15, nycti22, nycti26, nycti35, nycti36, nycti41, nycti43, nycti62, nycti68, nycti74	(Chang <i>et al.</i> , 2009)
	<b>Nesyt lesní</b> ( <i>Mycteria americana</i> )	W <sub>μ</sub> 03, W <sub>μ</sub> 08, W <sub>μ</sub> 09, W <sub>μ</sub> 13, W <sub>μ</sub> 14, W <sub>μ</sub> 17, W <sub>μ</sub> 18, W <sub>μ</sub> 19, W <sub>μ</sub> 20, W <sub>μ</sub> 23, W <sub>μ</sub> 24	(Tomasulo-Seccomandi <i>et al.</i> , 2003)
		WS1, WS2, WS4, WS6	(van den Bussche <i>et al.</i> , 1999)
	<b>Volavka velká</b> ( <i>Ardea herodias</i> )	Ah205, Ah208, Ah209, Ah210, Ah211, Ah212, Ah217, Ah320, Ah341, Ah343, Ah414, Ah421, Ah517, Ah522, Ah526, Ah536, Ah630	(McGuire <i>et Noor</i> , 2002)
	<b>Volavka žlutozobá</b> ( <i>Egretta eulophotes</i> )	Ae01, Ae04, Ae05, Ae09, Ae13, Ae24, Ae25, Ae26, Ae27, Ae28, Ae30, Ae35, Ae36, Ae37, Ae38, Ae42, Ae44, Ae47	(Huang <i>et al.</i> , 2009)
<b><u>VESLONOŽÍ</u></b>	<b>Fregatka obecná</b> ( <i>Fregata minor</i> )	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18	(Dearborn <i>et al.</i> , 2008)
	<b>Kormorán galapážský</b> ( <i>Phalacrocorax harrisi</i> )	PhB2, PhB4, PhB11, PhC11, PhD11, PhF12, PhG8, PhG12	(Duffie <i>et al.</i> , 2008)
	<b>Kormorán ušatý</b> ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	COR01, COR03, COR05, COR06, COR07, COR12, COR15, COR17, COR19, COR20, COR21, COR22, COR23, COR26, COR28, COR30, COR31, COR35, COR38, COR40, COR41, COR43, COR45, COR47	(Fike <i>et al.</i> , 2009)
		Dcco-01, Dcco-02, Dcco-03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08	(Mercer <i>et al.</i> , 2010)

<b><u>VESLONOŽÍ</u></b>	<b>Kormorán velký</b> ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )	PcD 2, PcD 4, PcD 5, PcD 6, PcT 1, PcT 3, PcT 4	(Piertney <i>et al.</i> , 1998)
	<b>Pelikán bílý</b> ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265, PEL304	(de Ponte Machado <i>et al.</i> , 2009)
	<b>Pelikán severoamerický</b> ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	PeEr01, PeEr02, PeEr03, PeEr04, PeEr05, PeEr06, PeEr07, PeEr08, PeEr09	(Hickman <i>et al.</i> , 2008)
	<b>Terej červenonohý</b> ( <i>Sula sula</i> )	Ss1B-16, Ss1B-51, Ss1B-57, Ss1B- 98, Ss1B-106, Ss1B-142, Ss2B-2, Ss2B-35, Ss2B-48, Ss2B 71, Ss2B- 88, Ss2B-92, Ss2B-110, Ss2B-138, Ss2B-153	(Morris-Pocock <i>et al.</i> , 2010)
	<b>Terej guánový</b> ( <i>Sula variegata</i> )	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-95, Sv2A-152, Sv2B-27, Sv2B-138	(Taylor <i>et al.</i> , 2009)
	<b>Terej modronohý</b> ( <i>Sula nebouxii</i> )	Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B-100	(Taylor <i>et al.</i> , 2009)
	<b>Terej modronohý</b> ( <i>Sula nebouxii</i> )	BOOB-RM2-F07, BOOB-RM3- D07, BOOB-RM3-F11, BOOBRM4-A08, BOOB-RM4- B03, BOOB-RM4-C03, BOOB-RM4- D07, BOOB-RM4-E03, BOOBRM4-E10, BOOB-RM4- F11, BOOB-RM4-G03	(Faircloth <i>et al.</i> , 2009)
<b><u>PLAMEŇÁCI</u></b>	<b>Plameňák karibský</b> ( <i>Phoenicopterus ruber</i> )	Pruμ1, Pruμ2, Pruμ3, Pruμ4, Pruμ5, Pruμ6, Pruμ7, Pruμ8, Pruμ9, Pruμ13	(Kapil <i>et al.</i> , 2010)
	<b>Plameňák růžový</b> ( <i>Phoenicopterus roseus</i> )	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139	(Geraci <i>et al.</i> , 2010)
<b><u>POTÁPKY</u></b>	<b>Potápka rudokrká</b> ( <i>Podiceps grisegena</i> )	PgAAT1, PgAAT3, PgAAT6, PgAAT8, PgAAT25, PgAAT34, PgAAT41	(Sachs <i>et Hughes</i> , 1999)
<b><u>POTÁPLICE</u></b>	<b>Potáplice lední</b> ( <i>Gavia immer</i> )	GimA9EPA, GimA12EPA, GimC5EPA, GimC11EPA, GimD9EPA, GimD12EPA, GimE11EPA	(McMillan <i>et al.</i> , 2004)

<b><u>DLOUHO - KŘÍDLÍ</u></b>	<b>Alkounek drobný</b> ( <i>Aethia pygmaea</i> )	Apy06, Apy07	(Dawson <i>et al.</i> , 2005)
<b><u>VRUBOZUBÍ</u></b>	<b>Kachna divoká</b> ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	APH07, APH 09, APH08, APH12, APH13, APH16	(Maak <i>et al.</i> , 2000)
	<b>Kachna pižmová</b> ( <i>Cairina moschata</i> )	CmAAT16, CmAAT35, CmAAT38	(Stai <i>et Hughes</i> , 2003)
	<b>Kachnice laločnatá</b> ( <i>Biziura lobata</i> )	Blm1, Blm10, Blm12	(Guay <i>et Mulder</i> , 2005)
	<b>Kajka mořská</b> ( <i>Somateria mollissima</i> )	Smo10	(Paulus <i>et</i> Tiedemann, 2003)
<b><u>TUČŇÁCI</u></b>	<b>Tučňák kroužkový</b> ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	AM13	(Roeder <i>et al.</i> , 2001)
<b><u>SUDO - KOPYTNÍCI</u></b>	<b>Pratur indický, zebu</b> ( <i>Bos indicus</i> )	HEL1	(Lei <i>et al.</i> , 2005)

#### 4.3.1 PCR amplifikace DNA

Jednotlivé složky reakční směsi byly pipetovány do mikrozkušavek v pořadí, které uvádí Tabulka 2. Po napipetování všech složek byla směs zvortexována a krátce centrifugována. Každá reakce byla složena z 9 µl PCR mixu a 1 µl roztoku DNA (50 µg/ml).

**Tabulka 2:** Složení reakční směsi pro 4 vzorky.

<b>Složky PCR směsi</b>	<b>Pipetované objemy [µ]</b>
Deionizovaná voda	29,7
Storage Buffer 10x	4,5
Roztok MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	2,7
Roztok dNTPs (20 µmol/l)	0,5
Primery F a R (10 µmol/l)	2,2
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	0,6

### Základní časový a teplotní profil PCR reakce:

1. 94 °C: 5 min	1 cyklus
2. 94 °C: 30 s 50 °C: 30 s 72 °C: 30 s	35 cyklů
3. 72 °C: 7 min	1 cyklus

#### 4.3.2 Zpracování PCR produktů

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

Větší sklo bylo omyto deionizovanou vodou, poté otřeno do sucha. Plocha většího skla, která se přímo dotýkala gelu, byla navíc ošetřena přípravkem pro odpuzování vody (působení přípravku 5 min). Menší sklo bylo omytu vodou za použití běžného saponátu a z obou stran opláchnuto deionizovanou vodou, otřeno do sucha. Plocha dotýkající se gelu byla dále ošetřena roztokem 0,5% kys. octové v 96% etanolu s 3  $\mu$ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Doba působení 5 min, poté bylo sklo opláchnuto 4x 96% etanolem.

Na větší sklo byla přiložena dvojice spacerů (0,4 mm silné), ošetřenou plochou na ně bylo položeno menší sklo. Spacery byly umístěny na hranu skel a skla byla upevněna pomocí klipsů.

Příprava 6% polyakrylamidového gelu a průběh elektroforetické separace:

1. 60 ml 6% akrylamidu, 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného a 40  $\mu$ l N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu bylo smíseno v kádince a roztok byl opatrně vléván mezi skla zajištěná klipsy.
2. Po vyplnění skel gelem byl na místo, kam se později pipetovaly vzorky vsunut hřebínek jeho rovnou stranou, skla byla opět sepnuta klipsy a gel polymerizoval minimálně 1 hod.
3. Po ztuhnutí gelu byla skla důkladně omyta, osušena, umístěna do elektroforetické komůrky a řádně upevněna. Katodový i anodový prostor

komůrky byl zalit 0,5x TBE pufrem, hřebínek byl opatrně vysunut a prostor vzniklý po hřebínku byl vyčištěn od zbytků gelu a bublin.

4. Komůrka byla zapojena ke zdroji stejnosměrného proudu a gel byl předehříván asi 30 min při hodnotě 90 W.
5. V proběhu nahřívání byl PCR produkt smíchán s nanášecím pufrem a denaturován v termocykér, poté okamžitě vložen do ledové tříšti.
6. Během denaturace byla komůrka odpojena od zdroje, došlo k vložení hřebínku (zoubky asi 1 mm hluboko v gelu). Do mezer byl vnesen vzorek (2  $\mu$ l). Poté byl katodový prostor znovu uzavřen, zdroj nastaven na hodnotu 70 W a proud byl spuštěn.
7. Čas separace byl pak dále optimalizován, tak aby bylo možné zjistit jednotlivé polymorfismy. Nejčastěji se jednalo o 1 – 3 hodiny.

Vizualizace gelu po dokončení elektroforetické separace:

1. Po ukončení separace byl zdroj proudu vypnut, skla byla vytažena z komůrky a následně oddělena od sebe tak, aby nedošlo k poškození gelu se separovanými vzorky.
2. Sklo s nalepeným gelem bylo, gelem vzhůru, vloženo do fotomisky a zalito fix/stop roztokem, v něm ponecháno minimálně 20 min.
3. Po uplynutí 20 min byl gel 3x promyt deionizovanou vodou a zalit roztokem  $\text{HNO}_3$  po dobu 5 min.
4. Poté došlo k promytí deionizovanou vodou (4x) a gel byl dále vloženo do fotomisky s roztokem  $\text{AgNO}_3$ , do něž byl těsně před použitím přidán formaldehyd (1,2 ml). Na třepačce byla miska s gelem ponechána 30 min.
5. Roztok  $\text{AgNO}_3$  byl slit do stejné nádoby, gel byl promyt deionizovanou vodou a ponořen do roztoku vývojky. Po vizualizování proužků produktů následovalo zalití fix/stop roztokem.
6. Nakonec byl gel ponořen do deionizované vody a vysušen. Po vysušení byl gel vyhodnocen na negatoskopu a následně naskenován. Poté bylo sklo s gelem ponořeno do roztoku  $\text{NaOH}$  o koncentraci 1 mol/l a umyto pro další použití.

#### 4.4 Seznam použitých chemikálií

- Akrylamid (Serva)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400 μl každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol - 96% roztok (Seliko Olomouc)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na<sub>2</sub>EDTA) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Lachema)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová - ledová (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N, N'-methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N-tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Rain Repellent - přípravek odpuzující vodu ze skel automobilů (Turtle Wax Europe B.V.)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

#### 4.5 Seznam použitých roztoků

- *Fenol pro izolaci DNA pH 7,9 ± 0,2:*  
100 ml fenol (Sigma P-4557) pH 6,7 ± 0,2  
6,5 ml ekvilibrační pufr pH 10,5 (Sigma B-5658) (Tris 0,01 mol/l pH 8,0,  
EDTA 0,001 mol/l)  
protřepat a nechat 2 – 4 hodiny stát  
uchovávat max. 6 měsíců ve 4 °C
- *Fix/stop roztok:*  
80 ml ledové kyseliny octové  
objem doplnit deionizovanou H<sub>2</sub>O na 800 ml
- *Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:*  
0,125 g bromfenolové modře  
0,125 g xylenové modře  
25 ml deionizované vody  
100 ml formamid
- *Polyakrylamidový gel (6%):*  
60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu  
400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
40 µl N, N, N', N'-tetramethylethyldiaminu
- *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  
doplnit deionizovanou vodou na 1000 ml



- *Roztok 10% peroxidisíranu amonného:*  
1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$   
rozpustit v 10 ml deionizované vody  
uchovávat v mikrokumavkách po 400  $\mu\text{l}$  v  $-20\text{ }^\circ\text{C}$
- *Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu (molekulární lepidlo):*  
1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu  
3  $\mu\text{l}$  3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu
- *Roztok 1% kyseliny dusičné  $\text{HNO}_3$ :*  
12 ml 65%  $\text{HNO}_3$   
objem doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  na 800 ml
- *Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného  $\text{AgNO}_3$ :*  
0,8 g  $\text{AgNO}_3$   
objem doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  na 800 ml  
před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu
- *Roztok hydroxidu sodného  $\text{NaOH}$  1 mol/l:*  
40 g hydroxidu sodného  
doplnit deionizovanou vodou na 1 l
- *Roztok octanu sodného  $\text{CH}_3\text{COONa}$  3 mol/l:*  
408,24 g trihydrátu octanu sodného  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$   
rozpustit v 800 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$   
upravit pH na hodnotu 5,2 pomocí ledové kyseliny octové  
objem doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  na 1 l
- *TE pufr:*  
10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0  
200  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 mol/l, pH 8,0  
rozpustit v 800 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$   
po rozpuštění doplnit na 1 l a zfiltrvat

- *Vývojka:*  
24 g uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
objem doplnit deionizovanou H<sub>2</sub>O na 800 ml uložit ve 4 °C  
před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- *Zásobní roztok 10x TBE pufru:*  
108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)  
55 g kyseliny borité H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
40 ml roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0  
doplnit deionizovanou vodou na 1 l
- *6% zásobní roztok akrylamidu:*  
420 g močoviny  
484 ml deionizované H<sub>2</sub>O  
50 ml 10x TBE  
150 ml 40 % zásobního roztoku akrylamid: N,N'-metylenbisakrylamid 19:1  
po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

#### 4.6 Seznam použitých laboratorních přístrojů

- Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)
- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirpool)
- Laboratorní váhy max 620g +/- 0,1 g ( BelEngineering)
- Magnetická míchačka Mr Hei – Standard (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette 0,5 až 10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichpipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga Cleaver Scientific Ltd
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna HS 122S (Chirana)

- Termocyklér PTC 100-96 VHB (Bioteca)
- Termocyklér XP Thermal Cycller (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

## **5 VÝSEDKY**















## **6 DISKUZE**

















## 7 ZÁVĚR

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů pomocí *cross-species* PCR amplifikace DNA u 4 nepříbuzných jedinců ibise hagedaše (*Bostrychia hagedash*) a vertikální elektroforetické separace vzniklých amplikonů v 6% polyakrylamidovém gelu. Z celkového počtu 340 testovaných párů primerů jich 38 z nich amplifikovalo polymorfní mikrosatelitové lokusy.

Nalezené polymorfní mikrosatelitové lokusy pocházely od čápa bílého (*Ciconia ciconia*), ibise japonského (*Nipponia nippon*), ibise rudého (*Eudocimus ruber*), kolpíka malého (*Platalea minor*), kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a nesyta lesního (*Mycteria americana*) z řádu brodiví (Ciconiiformes), z řádu vrubozubí (Anseriformes) pocházely mikrosatelitové lokusy od kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), dále z fregatky obecné (*Fregata minor*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax aureus*), kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), tereje červenonohého (*Sula sula*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) patřících do řádu veslonoží (Pelecaniformes), z řádu potápek (Podicipediformes) pocházely od potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*), z plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) a karibského (*P. ruber*) patřících do řádu plameňáků (Phoenicopteriformes).

Počet alel na jeden mikrosatelitový lokus se pohyboval od 2 do 4. Zjištěná heterozygotnost byla nejčastěji 0,5.

Mnou nalezené polymorfní mikrosatelitové lokusy by mohly být dále využity pro studium determinace paternity a pro analýzu příuzenských vztahů u jednotlivých jedinců ibise hagedaše (*Bostrychia hagedash*).

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- A adenin
- AFLP polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů (*Amplified Fragment Length Polymorfism*)
- bp pár bází (*base pair*)
- C cytozin
- DNA deoxyribonukleová kyselina
- D4DR gen dopaminového receptoru (*D4 Dopamine Receptor gene*)
- FIASCO metoda izolace mikrosatelitových markerů (*Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats*)
- G guanin
- IUCN Mezinárodní svaz ochrany přírody a přírodních zdrojů (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*)
- PAGE diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
- PCR polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)
- RAPD náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (*Random Amplified Polymorphic DNA*)
- RNA ribonukleová kyselina
- SSR označení mikrosatelitů (*Single Sequence Repeats*)
- STR označení mikrosatelitů (*Single Tandem Repeats*)
- T tymin
- T<sub>a</sub> *annealing* teplota PCR reakce (*Annealing temperature*)
- U uracil

## 9 POUŽITÁ LITERATURA

Anonymous (2010): Zařazení v systému. Biolib. [www.biolib.cz](http://www.biolib.cz)

Anonymous (2009): BirdLife International 2009. *Bostrychia hagedash*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)

Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi M., G., Bered, F., Fay, F.M., Lexer, Ch. (2007): Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16, 3759-3767

Bejček V., Šťastný K. (1999): Encyklopedie ptáků. Rebo Productions, Čestlice.

Campbel, N.A., Reece, B.J. (2007): Biologie. Computer Press, Brno. 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.

Dearborn D. C., Hailer F., Fleischer R. C. (2008): Microsatellite primers for relatedness and polation structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Frigatidae). *Molecular Ecology Resources* 8, 1399-1401.

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.

Duffie C., Glenn T. C., Hagen C., Parker P. (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources* 8, 625-627.

Dvořáková, B. (2010): Analýza polymorfních cross-species mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). - Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Faircloth B. C., Ramos A., Drummond H., Gowaty P. A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxii*). *Conservation Genetic 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.

Gaisler, J., Zima, J. (2007): Zoologie obratlovců. Academia, Praha.

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.

Hackett, S.H., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C., Yuri, T. (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* 320, 1763-1768.

Hanzák, J., Hudec, K. (1974): Světem zvířat, díl 2, část 1., Ptáci. Albatros, Praha.

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.

Hickman C. R., Peters M. B., Crawford N. G. *et al.* (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* 8, 1439-1441.

Hill, A., Clay Green, M. (2010): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genet Resour* , **in press**

Hofrichterová, A.(2008): Ročenka Unie českých a slovenských zoologických zahrad. Zoologická zahrada hl. m.Prahy pod záštitou Unie českých a slovenských zoologických zahrad a výkonných orgánů MŽP a CITES

Huang, X., Zhou, X., Chen, M., Fang, W., Chen, X. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics*, **in press**.

Hudec, K., Balát, F., Černý, V., Černý, W., Ferianc, O., Folk, Č., Formánek, J., Gaiser, J., Hachler, E., Hanzák, J., Havlín, J., Hora J., Chalupský, J., Klíma, M., Klůz, Z., Kožená, I., Kux, Z., Matoušek, B., Mošanský, A., Pelz, P., Ryšavý, B., Šťastný, K., Toufar, J., Veselovský, V. (1994): Ptáci - Aves, Díl I.Academia, Praha.

Chang Q., Cao F-H, Zhu L-F, Zhang B-W, Zhou K-Y (2005): Microsatellite variation and genetic diversity in the black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* in the Loir reaches of Yangtze River. *Acta Zoologica Sinica* 51, 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.

Chmelařová, A. (2010): Analýza polymorfních cross-species mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). - Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Ji, Y.-J., Liu, Y.-D., Ding, C.-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.

Kapil, R., Sawyer, G.M., Preston, L., Benjamin, R.C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamenco (*Phoenicopterus ruber ruber*). **Preprint.**

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* 3, 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.

Mayr, G. (2007): Avian higher-level phylogeny: well-supported clades and what we can learn from a phylogenetic analysis of 2954 morphological characters. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46, 63-72.

McGuire H. L., Noor M. A. F. (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes* 2, 170-172.

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 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., Friensen, V.L. (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources*, **preprint**.

Nádvorník P., Drobek A., Čihák K.: (2008) Microsatellite markers for the study of paternity in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*) and Caribbean Flamingo (*P. ruber*). *Journal of Agrobiology* 25, 93-96.

Obručová, E. (2009): Polymorfnní DNA mikrosatelity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). - Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

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.

Piertney S. B., Goostrey A., Dallas J. F., Carss D. N. (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology* 7, 138-140.

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

Roeder A. D., Marshall R. K., Mitchelson A. J. et al. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology* 10, 1645-1656.

Sachs J. L., Hughes C. R. (1999): Characterization of microsatellite loci for red-necked grebes *Podiceps grisegena*. *Molecular Ecology* 8, 687-688.

- Santos M. S., Goncalves E. C., Barbosa M. S. R., Silva A., Schneider M. P. C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes* 6, 307-309.
- Sawyer G. M., Benjamin R. C. (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes* 6, 677-679.
- 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.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V. (2005): *Metody molekulární biologie*. Vydavatelství MU, Brno.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): *Svět zvířat IV – Ptáci (1)*. Albatros, Praha.
- 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* 2, 525-528.
- Tomasulo-Seccomandi A. M., Schable N.A., Bryan A. L. Jr. *et al.* (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3, 563-566.
- Van den Bussche R. A., Harmon S. A., Baker R. J. *et al.* (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the Wood Stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 116, 1083-1092.
- Veselovský, Z. (2001): *Obecná ornitologie*. Academia, Praha.

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.