

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



**Charakteristika polymorfních *cross-species*  
mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*)  
a pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*)**

**Diplomová práce**

**Bc. Anna Chmelařová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2012**

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

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

V Olomouci dne ..... 2012

.....

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho trpělivost i čas, který mi během psaní diplomové práce věnoval, za jeho odbornou pomoc, věcné připomínky a motivaci pro mé další studium.

## Souhrn

Pelikán africký (*Pelecanus rufescens*) a pelikán kadeřavý (*P. crispus*) jsou zástupci řádu veslonozí (Pelecaniformes), u nichž dosud nebyly publikovány primery amplifikující polymorfní mikrosatelitové lokusy. V této diplomové práci jsem navázala na předchozí výzkum v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky zahrnující bakalářské práce Dvořáková (2010) a Chmelařová (2010) a diplomové práce Ranochová (2008) a Mikulová (2010). U šesti nepříbuzných jedinců pelikána afrického a šesti nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého jsem otestovala polymorfismus 47 mikrosatelitů odvozených od čápa východního (*Ciconia boyciana*), faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*), kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*) a volavky červenavé (*Egretta rufescens*). Znovu jsem vyzkoušela 77 párů primerů amplifikujících mikrosatelitové lokusy, které byly v předchozích bakalářských a diplomových pracích označeny jako nepolymorfní, ale byly polymorfní u pelikána bílého (*P. onocrotalus*) nebo skvrnozobého (*P. philippensis*). Se všemi polymorfními mikrosatelity, nalezenými v této práci i v předchozích bakalářských a diplomových pracích, jsem provedla genotypizaci u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického a 41 jedinců pelikána kadeřavého. Získaná data jsem zpracovala pomocí statistických programů Cervus 3.0.3 a Genepop 4.1. Charakterizovala jsem celkem 51 polymorfních mikrosatelitů u pelikána afrického a 23 polymorfních mikrosatelitů, respektive 24 polymorfních mikrosatelitových lokusů u pelikána kadeřavého. Na základě genotypizační analýzy 41 jedinců jsem ověřila příbuzenské vztahy v chovné skupině pelikána kadeřavého v ZOO Dvůr Králové.

## Summary

There have not been published any primers for amplification of polymorphic microsatellite loci in Pink-backed Pelican (*Pelecanus rufescens*) and Dalmatian Pelican (*P. crispus*). In this thesis, I have built on the previous research in the Laboratory of Population Genetics at the Department of Cell Biology and Genetics, including bachelor theses Dvořáková (2010) and Chmelařová (2010) and master theses Ranochová (2008) and Mikulová (2010). In six unrelated individuals Pink-backed Pelican and six unrelated individuals Dalmatian Pelican, I have tested polymorphism of 47 microsatellites derived from Oriental Stork (*Ciconia boyciana*), White-tailed Tropicbird (*Phaethon lepturus*), European Shag (*Phalacrocorax Aristotelis*) and Reddish Egret (*Egretta rufescens*). Again, I tried 77 primer pairs amplifying microsatellite loci, which were in the previous bachelor and master theses identified as non-polymorphic. These loci were polymorphic in Great White Pelican (*P. onocrotalus*) or Spot-billed Pelican (*P. philippensis*). I have carried out genotyping in 12 unrelated individuals Pink-backed Pelican and 41 individuals Dalmatian Pelican with all polymorphic microsatellites, found in this thesis and previous bachelor and master theses. The obtained data were processed using the statistical program Cervus 3.0.3 and Genepop 4.1. 51 polymorphic microsatellites in Pink-backed Pelican and 23 polymorphic microsatellites, respectively 24 polymorphic microsatellite loci in the Dalmatian Pelican were characterized. Based on genotyping analysis of 41 individuals I verified family relationships in a breeding group of Dalmatian Pelican in ZOO Dvur Kralove.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>9</b>
3.1	Čeďed' pelikánovití .....	9
3.1.1	Pelikán africký .....	11
3.1.2	Pelikán kadeřavý.....	12
3.2	Systematické zařazení pelikánů .....	12
3.3	Mikrosatelity .....	16
3.3.1	Mikrosatelity nalezené <i>de novo</i> u pelikánů.....	17
3.3.2	Mezidruhové amplifikace mikrosatelitů u brodivých.....	17
3.3.3	Mezidruhové amplifikace mikrosatelitů u plameňáků.....	19
3.3.4	Mezidruhové amplifikace mikrosatelitů u veslonohých.....	19
3.3.5	<i>Cross-species</i> mikrosatelity nalezené u pelikána afrického .....	21
3.3.6	<i>Cross-species</i> mikrosatelity nalezené u pelikána kadeřavého .....	23
3.3.7	Nové mikrosatelity vhodné pro testování u pelikánů .....	25
3.3.7.1	Nové mikrosatelity od druhů z řádu brodiví.....	25
3.3.7.2	Nové mikrosatelity od druhů z řádu veslonoží.....	25
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>27</b>
4.1	Biologický materiál.....	27
4.2	Metody .....	27
4.2.1	PCR amplifikace mikrosatelitové DNA .....	27
4.2.2	Zpracování PCR produktů .....	29
4.2.3	Statistické vyhodnocení výsledků.....	31
4.3	Použité chemikálie .....	31
4.4	Použité roztoky .....	32
4.5	Laboratorní přístroje .....	34
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>79</b>

# 1 Úvod

Mikrosatelity jsou tandemové repetitivní oblasti DNA, které se nacházejí v genomech eukaryotických organismů. Díky svým vlastnostem patří mezi významné molekulární markery využívané v mnoha oblastech. Uplatnění nacházejí při studiu příbuzenských vztahů jedinců v populaci, ověřování rodičovství nebo při fylogenetických studiích.

Mikrosatelity vhodné pro praktické využití u pelikánů byly *de novo* odvozeny u druhů pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*; de Ponte Machado *et al.*, 2009) a pelikán severoamerický (*P. erythrorhynchos*; Hickman *et al.*, 2008). Další polymorfní mikrosatelity pro druhy pelikán africký (*P. rufescens*), bílý, kadeřavý (*P. crispus*) a skvrnozobý (*P. philippensis*) byly objeveny na základě *cross-species* PCR amplifikace v bakalářských pracích Dvořáková (2010) a Chmelařová (2010) a diplomových pracích Ranochová (2008) a Mikulová (2010).

Tato diplomová práce by měla navázat na dosavadní výzkum v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky. Měla by se zabývat hledáním polymorfních mikrosatelitů u pelikána afrického a pelikána kadeřavého metodou *cross-species* PCR amplifikace s nově publikovanými primery odvozenými od čápa východního (*Ciconia boyciana*), faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*), kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*) a volavky červenavé (*Egretta rufescens*). Všechny dosud nalezené polymorfní mikrosatelity by dále měly být charakterizovány na základě genotypizační analýzy u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického a 41 jedinců pelikána kadeřavého. Rovněž je plánováno ověření příbuzenských vztahů 41 jedinců pelikána kadeřavého chovaných v ZOO Dvůr Králové.

## 2 Cíle práce

1. U šesti nepříbuzných jedinců pelikána afrického a pelikána kadeřavého otestovat polymorfismus mikrosatelitů pomocí PCR amplifikace s primery odvozenými od čápa východního (*Ciconia boyciana*), faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*), kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*) a volavky červenavé (*Egretta rufescens*).
2. Na základě těchto výsledků a výsledků bakalářských prací Dvořáková (2010) a Chmelařová (2010) a diplomových prací Mikulová (2010) a Ranochová (2008) charakterizovat *cross-species* mikrosatelity, které byly v těchto pracích popsány jako polymorfní u geneticky nepříbuzných jedinců těchto dvou druhů pelikánů.
3. Analýzou mikrosatelitů ověřit příbuzenské vztahy jedinců druhu pelikán kadeřavý tvořících chovnou skupinu v ZOO Dvůr Králové.
4. Sepsat literární rešerši na téma mezidruhové amplifikace mikrosatelitů s důrazem na velké vodní ptáky.



## 3 Literární přehled

### 3.1 Čeleď pelikánovití

Do čeledi pelikánovití (Pelecanidae) je různými autory zařazováno 7 nebo 8 recentních druhů. Ve starší literatuře (Brown *et al.*, 1982; del Hoyo *et al.*, 1992; Schreiber, 1994; Nelson, 2005) je uváděno pouze těchto 7 pelikánů:

- pelikán africký (*Pelecanus rufescens*)
- pelikán australský (*Pelecanus conspicillatus*)
- pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*)
- pelikán hnědý (*Pelecanus occidentalis*)
- pelikán kadeřavý (*Pelecanus crispus*)
- pelikán severoamerický (*Pelecanus erythrorhynchos*)
- pelikán skvrnozobý (*Pelecanus philippensis*)

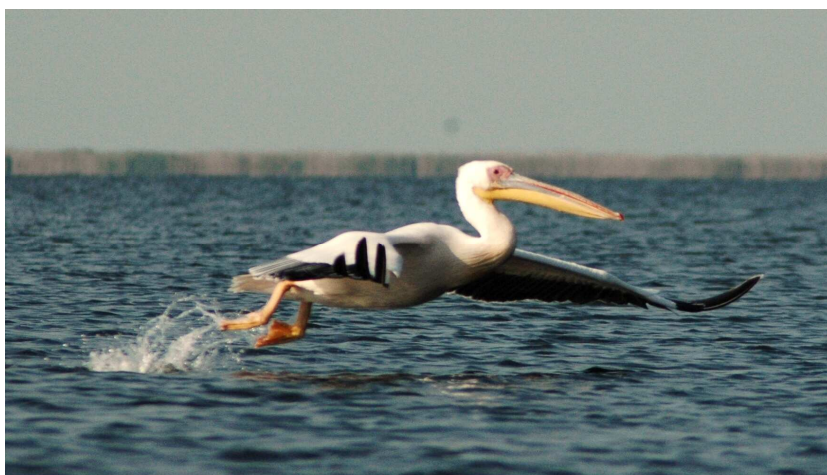
Osmým zástupcem je pelikán chilský (*Pelecanus thagus*), dříve popisován jako poddruh pelikána hnědého (*P. occidentalis thagus*). Za samostatný druh je podle South American Classification Committee považován teprve od roku 2007 (Anonymous, 2012a).

Pelikánovití jsou starobylou skupinou druhů ptáků. Ve fosilních záznamech se dochovaly pozůstatky nejméně deseti dalších pelikánů rodu *Pelecanus*. Kromě tohoto recentního rodu patří do čeledi pelikánovití také dva vyhynulé rody: *Protopelicanus* a *Miopelecanus* (del Hoyo *et al.*, 1992; Alderton, 1995).

Zástupci čeledi patří k nejtěžším létajícím ptákům. Jsou to velcí vodní ptáci s mohutným zobákem a roztažitelným hrdelním vakem, skvěle adaptovaní k lovu ryb. Vyskytují se v tropickém i mírném pásu na obou polokoulích, chybí pouze na východě Jižní Ameriky, na Novém Zélandě a v Oceánii. Obývají především vnitrozemská jezera a ústí velkých řek, některé druhy žijí i na mořském pobřeží. Zbarvení sladkovodních druhů je šedé nebo bílé, zatímco pelikáni žijící u moře jsou hnědí (Hanzák *et Hudec*, 1974; Brown *et al.*, 1982; del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998; Dungel *et Hudec*, 2001; Nelson, 2005).

Krátké nohy se čtyřmi prsty spojenými plovací blánou směřující dozadu umožňují efektivní pádlování. Při pohybu na souši tato adaptace pro pohyb ve vodě působí pelikánům potíže. Po zemi se přesunují kolébovým pohybem a vypadají tak poněkud neohrabaně. Ve vodě i ve vzduchu jsou však velmi obratní. Velikost a váha těla způsobuje pelikánům problémy při vzletání z vodní hladiny (obr č. 1 a 2), obvykle se po

ní rozbíhají za současných odrazů oběma nohama, při kterých si pomáhají mácháním křídly. Dlouhá a široká křídla umožňují snadné plachtění. Pelikáni mohou bez přestávky letět až 24 hodin a během této doby jsou schopni překonat vzdálenost až 500 km. Maximální rychlost letu je 56 km/h. Létají s pokrčeným krkem a hlavou mezi křídly, což jim umožňuje přitáhnout mohutný zobák ke hrudi, kde je blíže těžišti těla (Brown *et al.*, 1982; del Hoyo *et al.*, 1992; Schreiber, 1994; Šťastný *et al.*, 1998; Nelson, 2005).



**Obr. č. 1, 2:** Pelikán bílý vzletající z hladiny jezera Puiu v oblasti delty Dunaje.  
Foto: Zdeněk Chmelař, 2005 ©.

Výběr vhodného místa pro hnízdění je závislý na dostatku potravy a absenci predátorů. Některé druhy pelikánů hnízdí na stromech, jiné si staví hnízda na zemi. Druhy hnízdící na zemi formují hustší a těsnější kolonie než druhy hnízdící na

stromech, které často tvoří smíšené kolonie s jinými ptáky, především zástupci řádu brodiví (Ciconiiformes). Samice snáší 1 až 6 vajec, nejčastěji však 2. V sezení na vejcích se střídají oba rodiče, doba inkubace se liší podle konkrétního druhu. Mláďata se líhnou postupně, obvykle ve dvoudenních intervalech, podle toho, v jakém pořadí byla vejce snesena. Zpočátku jsou holá a bezbranná, prachové peří jim začíná růst od 3. až 8. dne života. Mláďata mladší než dva týdny jsou až třicetkrát za den krmena tekutou stravou, poté jim rodiče nosí natrávené ryby. Při krmení zasouvají do rodičovského vaku zobáky, někdy i celé hlavičky. Pelikáni pohlavně dospívají ve 3 až 5 letech, hnízdění mladých samic však vždy nebývá úspěšné (Hanzák *et* Hudec, 1974; del Hoyo *et al.*, 1992; Schreiber, 1994; Šťastný *et al.*, 1998; Nelson, 2005).

Dospělci se živí téměř výhradně rybami, které polykají vcelku. Druhové zastoupení jejich kořisti se liší podle oblastí výskytu jednotlivých pelikánů. Pelikáni loví ve skupinách, což u ptáků není příliš obvyklé. Ve formaci složené z 8 až 40 jedinců zanořují zobáky do vody a pravidelně rozevírají křídla nebo jimi bijí o vodní hladinu. Nahánějí tak ryby na mělčinu podobně jako rybáři využívající keser. Někdy vytvoří dvě řady, které se přibližují a nahánějí si ryby navzájem (del Hoyo *et al.*, 1992; Schreiber, 1994; Šťastný *et al.*, 1998; Nelson, 2005).

### **3.1.1 Pelikán africký**

Pelikán africký se vyskytuje ve střední a východní Africe, v Saúdské Arábii a v okolí Rudého moře, dříve měl hnízdní kolonie také západě Madagaskaru. Obývá širokou škálu sladkovodních biotopů jako jsou jezera, řeky, bažiny, sezónně zaplavované oblasti, ústí a delty řek. Hnízdí na stromech v malých skupinách i větších koloniích v počtu 20 až 500 párů. Jedná se o menší druh s hmotností 4 až 7 kg a maximálním rozpětím křídel 290 cm. Zbarvení dospělců je světle šedé, ve spodní části těla a na zádech přechází v růžové. Zobák je narůžovělý, nohy mohou být šedé, žluté nebo karmínové. Živí se výhradně rybami, převážně rody *Tilapia* a *Haplochromis*. Loví ve skupinách, ale nevyužívá koordinovaný styl lovu jako jiné druhy pelikánů. Mezinárodní unie pro ochranu přírody (IUCN) jej zařazuje do skupiny málo dotčených druhů (del Hoyo *et al.*, 1992; Nelson, 2005; Anonymous, 2012b).

### 3.1.2 Pelikán kadeřavý

Pelikán kadeřavý se vyskytuje v jihovýchodní Evropě, v jižní a jihozápadní Asii a v severovýchodní Africe. Obývá vnitrozemské mokřiny, jezera, břehy a delty velkých řek. Hnízdí ve vodní vegetaci na ostrovech izolovaných od pevniny, aby mláďata uchránil před suchozemskými predátory jako jsou divoká prasata. Je největším z pelikánů, může dosahovat hmotnosti 13 až 15 kg s maximálním rozpětím křídel 345 cm. Dospělci jsou stříbřitě bílí s popelavými a černými letkami. Nohy mají šedé, zobák šedý s oranžovou špičkou, hrdelní vak žlutooranžový. V době hnízdění se samcům na temeni hlavy a krku vytvářejí nápadné rozčuchané chocholky, podle nichž získal tento pelikán svůj český název. Živí se převážně rybami, které loví sami, ve dvojicích nebo trojicích. Druhá skladba potravy záleží na typu vodního zdroje. Ve vnitrozemí jsou v jejich potravě nejvíce zastoupeny rody *Cyprinus*, *Perca* či *Rutilus*, v oblastech s brakickou vodou *Anguilla*, *Mugil*, *Gobius* nebo *Belone*. Podle Mezinárodní unie pro ochranu přírody (IUCN) je zařazen v Červeném seznamu mezi tzv. zranitelné druhy (del Hoyo *et al.*, 1992; Nelson, 2005; Anonymous, 2012c).

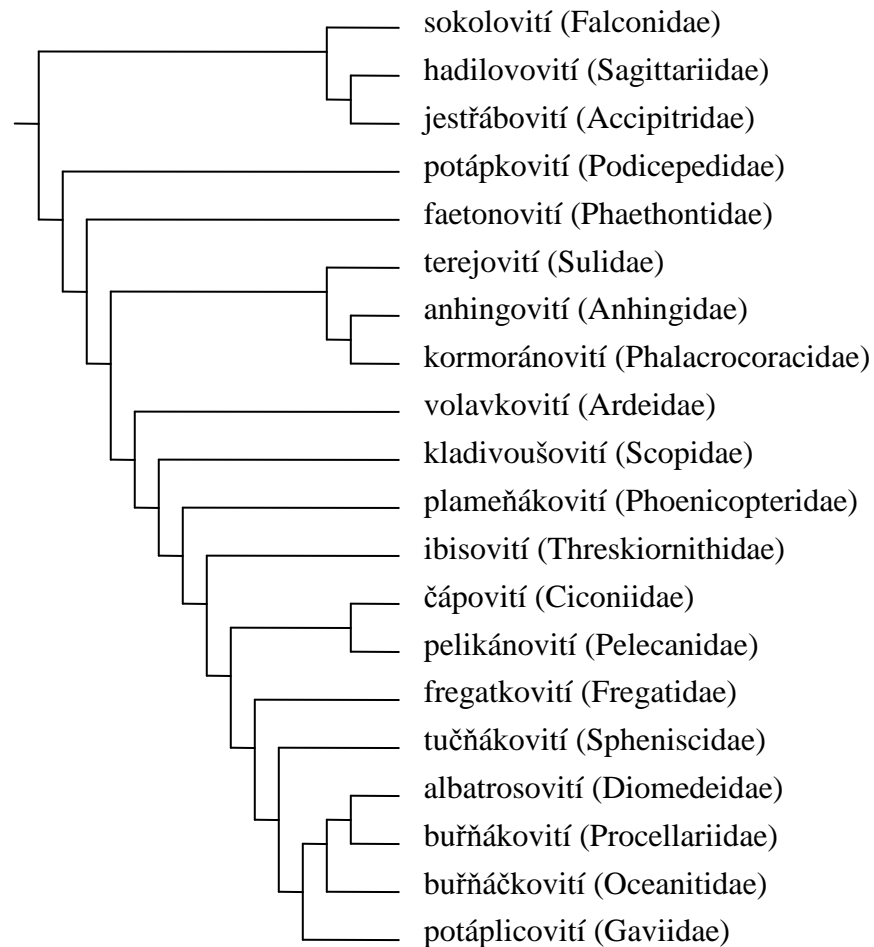
## 3.2 Systematické zařazení pelikánů

Podle tradiční systematické klasifikace založené na morfologické podobnosti jsou pelikánovití zařazováni do řádu veslonozí (Pelecaniformes) spolu s vodními ptáky z dalších 5 čeledí: anhingovití (Anhingidae), faetonovití (Phaetontidae), fregatkovití (Fregatidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae) a terejovití (Sulidae) (Nelson, 2005). Pro tyto ptáky je společná charakteristická veslovací noha se 4 prsty spojenými plovací blánou.

V poslední době se mnoho autorů snaží o přeuspořádání systému ptáků na základě molekulárně-biologických analýz. Tato snaha již vedla k objevu mnoha případů, kdy k sobě byly přiřazeny druhy zcela nepříbuzné na základě podobnosti způsobené konvergencí. Ačkoli jsou stále publikovány nové studie pozměňující současné poznatky o evolučním vývoji ptáků, jejich fylogenetické vztahy nejsou zcela vyjasněny. Proto je dosud využíváno spíše tradiční členění založené na morfologii.

Jednou z prvních metod molekulární biologie využívaných k odhalení fylogeneze ptáků byla DNA-DNA hybridizace, které se v několika svých pracích věnovali Sibley a Ahlquist. Na základě svých objevů poprvé naznačili příbuznost pelikánů s člunozobcem africkým (*Balaeniceps rex*), který byl považován za zástupce brodivých

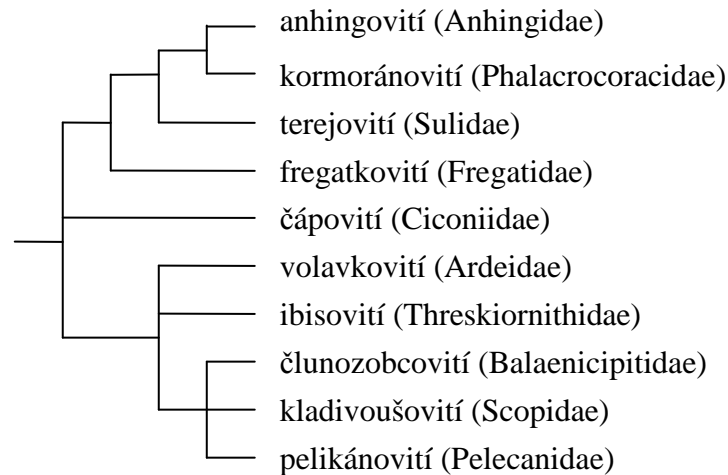
(Sibley *et al.*, 1988). Později vydaný kladogram, rovněž nazývaný „Tapestry“ (obr. č. 3), měl velký vliv na systematickou klasifikaci a stal se podkladem pro mnoho interpretací evoluce ptáků (Sibley *et Ahlquist*, 1990). Autoři nenavrhlí experiment příliš vhodně, protože jej založili na mylném předpokladu monofyletického původu některých skupin, které jsou dnes již považovány za polyfyletické. Jejich práce proto byla později opakovaně kritizována (Harshman, 1994; Cracraft *et al.*, 2004).



**Obr. č. 3:** Část kladogramu fylogeneze ptáků sestaveného na základě DNA-DNA hybridizace (Sibley *et Ahlquist*, 1990). Upraveno podle Cracraft *et al.* (2004).

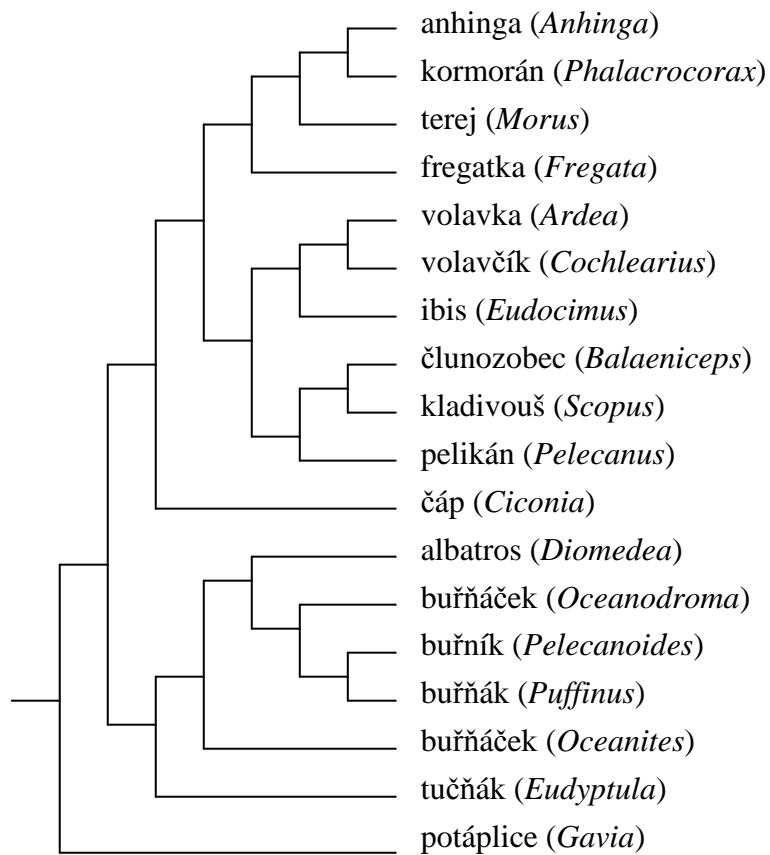
Fain *et Houde* (2004) zjišťovali fylogenetickou příbuznost ptáků na základě sekvenčních rozdílů v 7 intronech genu pro beta-fibrinogen. Stejně jako další autoři jiných studií srovnávající molekulární i morfologická data (van Tuinen *et al.*, 2001; Mayr *et al.*, 2003) došli k závěru, že pelikánovití (Pelecanidae) tvoří monofyletickou skupinu společně s člunozobcem africkým a kladivoušem africkým (*Scopus umbretta*).

Ericson *et al.* (2006) studovali u 87 ptačích druhů polymorfismus jaderných genů ležících na různých chromozomech. Porovnávali 5007 bp dlouhé úseky DNA získané z 5 genových oblastí (beta-fibrinogen, c-myc, myoglobin, ornithin dekarboxylázu a RAG-1). Z jejich výzkumu vyplývá, že pelikáni, člunozobec a kladivouš tvoří větší vývojově blízkou skupinu s volavkovitými, ibisovitými a vzdáleněji také čápoovitými viz obr. č. 4.



**Obr. č. 4:** Kladogram fylogeneze veslonohých a brodivých sestavený na základě bayesiánské analýzy 5 jaderných genů (Ericson *et al.*, 2006). Upraveno podle Mayr (2008).

V jedné z nejobsáhlejších prací věnující se fylogenezi ptáků na molekulární úrovni autoři porovnávali přibližně 32 kb dlouhé úseky jaderné DNA získané z 19 nezávislých lokusů u celkem 169 ptačích druhů (Hackett *et al.*, 2008). Použité lokusy jsou v genomu kura bankivského (*Gallus gallus*) lokalizovány na 15 různých chromozomech, jedná se o introny, kódující exony i netranslatované sekvence (UTRs). Výsledky analýzy odhalily dobře vyhraněný klad vodních ptáků zahrnující veslonohé, čápy a jejich příbuzné, trubkonosé, tučňáky a potáplice. Autoři z veslonohých vyřadili tradiční faetony, klad vodních ptáků rovněž postrádá plameňáky nebo potápky. Tyto skupiny zřejmě prošly podobným evolučním vývojem jako faetoni. Část tohoto kladogramu znázorňující fylogenezi vodních ptáků je uvedena na obrázku č. 5.



**Obr. č. 5:** Kladogram fylogeneze vodních ptáků sestavený na základě analýzy 19 nezávislých lokusů získaných z jaderné DNA metodou maximální podobnosti. Upraveno podle Hackett *et al.* (2008).

Nejaktuálnější klasifikační systém ptáků publikovaný slovenskou sekcí BirdLife zavádí k původnímu řádu veslonozí (Pelecaniformes) 2 nové řády – Phaethontiformes a Suliformes. Phaethontiformes (faetoni) obsahují pouze zástupce rodu faeton, do Suliformes (veslonozí) patří anhingy, fregatky, kormoráni a terejové. Staronový řád Pelecaniformes (pelikáni) v této podobě zahrnuje pouze pelikánovité (Pelecanidae), člunozobcovité (Balaenicipitidae) a kladivoušovité (Scopidae) (Kovalik *et al.*, 2010). Je velmi pravděpodobné, že systematická klasifikace ptáků bude v budoucnu ještě několikrát změněna v závislosti na zjištění nových poznatků o jejich fylogenetickém vývoji.

### 3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou tandemové repetitivní sekvence s délkou motivu 1 až 6 bp (Tóth *et al.*, 2000), které se vyskytují u všech doposud zkoumaných organismů. Častěji se nacházejí v nekódujících oblastech DNA, v kódujících oblastech jsou zřejmě omezovány negativní selekcí posunových mutací při translaci. Pro mikrosatelity je charakteristická vysoká úroveň délkového polymorfizmu způsobená vysokou mutační rychlostí (Anmarkrud *et al.*, 2008). Jednotlivé alely se liší počtem repetice základního motivu. Za změnu počtu repetice je odpovědný mechanismus označovaný jako sklouznutí (*slippage*) DNA polymerázy. Ke vzniku nových alel může rovněž dojít působením nerovnoměrného crossing-overu, substitucemi či duplikacemi (Hancock, 1999).

Hypervariabilita, kodominantnost, snadná PCR amplifikace a jednoduchá identifikace alel po elektroforetické separaci jsou vlastnosti, díky nimž nacházejí mikrosatelity uplatnění v mnoha odvětvích. Umožňují diagnostikovat některé choroby, určovat otcovství či identifikovat jednotlivce v trestním řízení. Jsou využívány také při populačně-genetických, ekologických i fylogenetických studiích (Primmer *et al.*, 2005).

Nové mikrosatelity je možné hledat dvěma cestami: jejich *de novo* odvozením nebo *cross-species* amplifikací s použitím primerů navržených primárně pro jiný druh. Nalezení mikrosatelitů *de novo* z DNA daného druhu je finančně i časově nákladné, proto jsou takto získané lokusy obvykle testovány i u jiných druhů. *Cross-species* PCR amplifikace umožňuje zjistit, zda daný mikrosatelit poskytuje polymorfnní produkty také u jiného druhu (Primmer *et al.*, 1996). Nejlepší výsledky jsou při použití této metody dosaženy u příbuzných druhů, s rostoucí fylogenetickou vzdáleností se úspěšnost nalezení polymorfnních lokusů snižuje (Dawson *et al.*, 2006). Mezidruhová amplifikace mikrosatelitů a zachování jejich polymorfizmu je výrazně úspěšnější při použití EST-mikrosatelitů (Karaiskou *et al.*, 2008; Dawson *et al.*, 2010).

Téměř univerzální sada mikrosatelitových lokusů, které vykazují polymorfizmus u různých druhů, byla popsána pro největší ptačí řád pěvci (Passeriformes) (Galbusera *et al.*, 2000). U velkých vodních ptáků z řádů brodiví, plameňáci (Phoenicopteriformes) a veslonoží zatím nebyly nalezeny univerzální páry primerů amplifikující polymorfnní mikrosatelitové lokusy u většího množství druhů.



### 3.3.1 Mikrosatelity nalezené *de novo* u pelikánů

Dosud byly publikovány pouze dvě práce zabývající se odvozením mikrosatelitů pro pelikány *de novo*.

Hickman *et al.* (2008) popsali pro pelikána severoamerického 9 polymorfních mikrosatelitových lokusů PeEr01 až PeEr09 s počtem alel od 2 do 8. Použili směsný vzorek DNA izolovaný z prsních svalů 3 jedinců zabavených pytlákům v kanadském Saskatchewanu. Charakteristiky jednotlivých lokusů stanovili na základě testování 23 vzorků odebraných jedincům pelikána severoamerického ze 4 lokalit v Kanadě a USA, které reprezentují východní i západní oblast výskytu tohoto druhu.

De Ponte Machado *et al.* (2009) popsali pro pelikána bílého 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů PEL086 až PEL304 se 2 až 19 alelami. K jejich odvození použili DNA izolovanou z jediného jedince pelikána bílého. Tyto lokusy byly dále testovány u 3 druhů pelikánů za účelem zjištění úspěšnosti jejich *cross-species* PCR amplifikace. Jednalo se o pelikána afrického, hnědého a severoamerického. U všech čtyř druhů pelikánů byl polymorfní pouze mikrosatelitový lokus PEL149. U každého pelikána byly polymorfní ještě další 3 mikrosatelity. Alespoň u jednoho druhu pelikána bylo polymorfních 7 různých mikrosatelitů.

### 3.3.2 Mezidruhové amplifikace mikrosatelitů u brodivých

McGuire *et Noor* (2002) popsali 15 polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených od volavky velké (*Ardea herodias*). Tyto lokusy měly od 2 do 18 alel a jejich mezidruhová amplifikace byla dále testována u volavky bílé (*A. alba*), popelavé (*A. cinerea*) a jihoamerické (*A. cocoi*). U většiny mikrosatelitů došlo k úspěšné amplifikaci a tvorbě polymorfních produktů i u ostatních druhů volavek.

Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) publikovali u nesyta lesního (*Mycteria americana*) 11 polymorfních mikrosatelitů s počtem alel od 2 do 4. Shephard *et al.*, (2009) použili tyto primery amplifikující tyto oblasti při mezidruhovém testování u čápa bílého (*Ciconia ciconia*) a našli u něj 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Ji *et al.* (2004) použili primery určené k amplifikaci mikrosatelitových lokusů u ibise japonského (*Nipponia nippon*) ke *cross-species* testování na ibisu černohlavém (*Threskiornis melanocephalus*). Nalezli pět polymorfních lokusů, z nichž jeden byl polymorfní pouze u ibise černohlavého, avšak monomorfní u ibise japonského.

Chang *et al.* (2005) testovali mezidruhovou amplifikaci 17 mikrosatelitů odvozených od volavky velké u kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*). Produkty u osmi z nich byly polymorfní.

Lei *et al.* (2005) testovali u ibise japonského mezidruhovou amplifikaci 22 mikrosatelitů popsanych u kapra obecného (*Cyprinus carpio*), kura domácího (*Gallus gallus*) a pratura indického (*Bos indicus*). Nalezli čtyři polymorfní lokusy se 2 až 7 alelami. Dva byly odvozené od kapra obecného, dva od pratura indického.

Wilson (2008) hledal polymorfní *cross-species* mikrosatelity u ibise posvátného (*Threskiornis aethiopicus*). Použil tři lokusy odvozené od tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*), dva od ibise japonského a po jednom lokusu popsáném u lejska čenohlavého (*Ficedula hypoleuca*) a vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*). Nalezl dva polymorfní mikrosatelity navržené pro ibise japonského a tučňáka kroužkového.

Huang *et Zhou* (2011) testovali na vzorcích izolovaných z krve, svalů nebo peří 23 jedinců čápa východního (*Ciconia boyciana*) primery navržené k amplifikaci mikrosatelitů u jiných zástupců brodivých. Jednalo se o 7 párů primerů od čápa bílého, 12 párů primerů od ibise čínského a 17 párů primerů od volavky velké. Z celkového počtu 36 párů primerů poskytlo 24 detekovatelný PCR produkt, z nich bylo 11 mikrosatelitů polymorfních se 3 až 11 alelami. Polymorfní produkty vznikaly při amplifikaci s primery odvozenými od čápa bílého (5 lokusů) a volavky velké (6 lokusů). Tento výzkumný tým zkoušel u čápa východního také mezidruhovou amplifikaci mikrosatelitů navržených pro nesytu amerického. Nalezli tak další 3 polymorfní mikrosatelity (Wang *et al.*, 2011).

Ne všichni autoři u úspěšných mezidruhových amplifikací v řádu brodiví uvádějí, zda měly výsledné produkty jednu nebo více alel.

Huang *et al.* (2009) popsali u volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) 18 polymorfních mikrosatelitů s počtem alel od 2 do 9. Tyto lokusy testovali rovněž u volavky bílé (*Ardea alba*), čínské (*Ardeola bakchus*), pobřežní (*Egretta sacra*), rusohlavé (*Bubulcus ibis*) a stříbřité (*Egretta garzetta*). U volavky stříbřité došlo k úspěšné amplifikaci všech lokusů, o polymorfizmu produktů se však studie nezmiňuje.

Chang *et al.* (2009) našli u kvakoše nočního 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů se 4 až 13 alelami. Primery amplifikující tyto lokusy testovali u dalších 11 dalších zástupců čeledi volavkovití. Mezidruhová amplifikace byla velmi úspěšná,

lokusy nycti26 a nycti62 se amplifikovaly u všech zastoupených druhů. Autoři však neuvádějí, zda měly výsledné produkty více než jednu alelu.

Yeung *et al.* (2009) odvodili od kolpíka malého (*Platalea minor*) 23 polymorfních mikrosatelitových lokusů se 2 až 19 alelami. Amplifikaci těchto mikrosatelitů dále testovali u ibise posvátného (*Threskiornis aethiopicus*), ibise rudého (*Eudocimus ruber*), kolpíka růžového (*Platalea ajaja*), kvakoše nočního a volavky bílé. Ve výsledcích je porovnávána pouze různá intenzita PCR produktů.

### 3.3.3 Mezidruhové amplifikace mikrosatelitů u plameňáků

Kapil (2005) v disertační práci odvodil 6 polymorfních mikrosatelitů z DNA plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Lokusy měly od 3 do 14 alel. Jejich amplifikace byla testována u dalších druhů plameňáků: chilského (*Phoenicopterus chilensis*), malého (*Phoeniconaias minor*) a růžového (*Phoenicopterus roseus*), u nichž rovněž vznikaly polymorfní produkty. Jeden z lokusů se ukázal jako značně konzervovaný, jeho amplifikací vznikl polymorfní produkt u čápa marabu (*Leptoptilos crumeniferus*) z řádu brodiví.

Preston (2005) v disertační práci popsala 7 polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených od plameňáka karibského. Tyto mikrosatelity charakterizovala také u druhu plameňák růžový. V dalším výzkumu ve stejné laboratoři se ukázalo, že dva z nich poskytovaly polymorfní produkty i u čápa marabu (Kapil, 2005).

Nádvorník *et al.* (2008) testovali u plameňáka karibského a plameňáka růžového mezidruhovou amplifikaci 70 polymorfních mikrosatelitů popsanych u kolpíka růžového (*Ajaja ajaja*), kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), nesyta lesního, plameňáka karibského, potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*) a volavky velké. Nalezli tak 7 polymorfních lokusů u plameňáka růžového a 10 polymorfních lokusů u plameňáka karibského

### 3.3.4 Mezidruhové amplifikace mikrosatelitů u veslonohých

Piertney *et al.* (1998) publikovali 7 polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených od kormorána velkého s 9 až 49 alelami. Autoři testovali *cross-species* amplifikaci těchto mikrosatelitů u dalších čtyř kormoránů: chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*), ušatého (*P. auritus*), modrookého (*P. atriceps*) a australského poddruhu kormorána velkého (*P. c. novaehollandiae*), který je někdy

klasifikován jako samostatný druh. Kromě lokusu PcD4 vznikaly u všech výše uvedených druhů kormoránů polymorfní produkty s počtem alel od 2 do 12. Mikrosatelit PcD4 byl polymorfní pouze u kormorána velkého a jeho poddruhu *P. c. novaehollandiae*.

Duffie *et al.* (2008) studovali genetickou variabilitu ohroženého endemického druhu kormorán galapážský. Kromě čtyř polymorfních mikrosatelitů odvozených od tohoto druhu použili také polymorfní lokus PcT3 popsany u kormorána velkého (Piertney *et al.*, 1998).

Dawson *et al.* (2005) popsali u alkounka drobného (*Aethia pygmaea*) 17 mikrosatelitových lokusů s počtem alel od 1 do 11. Jejich *cross-species* amplifikaci testovali u 48 druhů ze 13 čeledí mořských ptáků. Z veslonohých byly zastoupeny tyto druhy: kormorán jižní (*Phalacrocorax georgianus*), kormorán chocholatý, fregatka vznešená (*Fregata magnificens*) a faeton žlutozobý (*Phaethon lepturus*). U kormoránů nevznikly žádné polymorfní produkty. U faetona žlutozobého byl polymorfní lokus Apy06, u fregatky vznešené Apy07. Oba měly shodně 2 alely.

Ranochová (2008) ve své diplomové práci testovala u pelikána bílého mezidruhovou amplifikaci mikrosatelitů odvozených od zástupců řádu pěvci. Bylo vybráno 35 páru primerů od budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*), budníčka západního (*Phylloscopus occipitalis*), křivky skotské (*Loxia scotia*), lejska čenohlavého, modropláštěníka nádherného (*Malurus cyaneus*), rákosníka seychelského (*Acrocephalus sechellensis*), sýkory modřinky (*Parus caeruleus*) a vlaštovky obecné. U pelikána bílého nevznikly s těmito primery žádné polymorfní produkty.

Morris-Pocock *et al.* (2010) publikovali 15 polymorfních mikrosatelitů nalezených u tereje červenonohého (*Sula sula*), tyto lokusy měly 2 až 11 alel. Mezidruhovou amplifikaci dále testovali u tereje guánového (*Sula variegata*) a modronohého (*Sula nebouxi*). Z 15 lokusů bylo 7 polymorfních minimálně u jednoho z terejů.

Taylor *et al.* (2010) popsali 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů vhodných pro studium mezidruhových hybridů tereje guánového a modronohého. U tereje guánového našli 8 polymorfních mikrosatelitů se 2 až 10 alelami, u tereje modronohého 9 mikrosatelitů s 2-12 alelami. *Cross-species* amplifikaci těchto lokusů dále testovali u tereje žlutohého (*Sula leucogaster*), u něhož zjistili variabilní polymorfismus, který dále nerozvádějí.

### 3.3.5 *Cross-species* mikrosatelity nalezené u pelikána afrického

V současné době není známa žádná vědecká studie popisující *de novo* odvození mikrosatelitů pro druh pelikán africký. Dosud byly u tohoto druhu publikovány pouze jedna diplomová a dvě bakalářské práce využívající metodu *cross-species* PCR amplifikace s primery navrženými původně pro jiné druhy ptáků. Bylo v nich objeveno celkem 39 polymorfních mikrosatelitových lokusů pro pelikána afrického. Souhrnné údaje o těchto mikrosatelitech jsou uvedeny v tabulce č. 1.

První výzkum věnující se této problematice vznikl na popud ZOO Dvůr Králové, která v současné době chová pět druhů pelikánů - pelikána afrického, australského, bílého, kadeřavého a skvrnozobého. Adéla Ranochová měla za úkol vypracovat vhodnou metodiku pro určování příbuzenských vztahů v chovných skupinách jednotlivých druhů pelikánů. Ve své bakalářské práci (Ranochová, 2006) se tímto problémem nejprve zabývala teoreticky, v diplomové práci pak navázala s praktickou částí (Ranochová, 2008). Autorka otestovala 62 párů primerů u 7 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Zvolené páry primerů byly původně popsány pro amplifikaci mikrosatelitů u ptáků ze 3 řádů: brodiví, potápky a veslonozí. Výsledkem diplomové práce bylo objevení a popsání 4 polymorfních mikrosatelitových lokusů. K původnímu záměru testování příbuzenských vztahů však byly vhodné pouze 3 z nich: PcT1, Ah536 a Eru03. U čtvrtého mikrosatelitu WS $\mu$ 20 byla u více než 50 % testovaných jedinců přítomna nulová alela v homozygotním stavu (Ranochová, 2008).

V navazující diplomové práci testovala Veronika Mikulová u 5 nepříbuzných jedinců pelikána afrického dalších 58 párů primerů amplifikujících mikrosatelitové oblasti. Tyto páry primerů byly odvozeny z DNA zástupců ze 3 řádů ptáků: brodiví, plameňáci a veslonozí. Rovněž byl vyzkoušen jeden pár primerů odvozený od pratora indického z řádu sudokopytníci (Artiodactyla). Autorka našla a charakterizovala soubor 9 polymorfních mikrosatelitových lokusů vhodných pro příbuzenské nebo paternitní studie (Mikulová, 2010).

V souběžně probíhající bakalářské práci použila Barbora Dvořáková dalších 221 párů primerů určených k amplifikaci mikrosatelitových oblastí u ptáků ze 7 řádů: brodiví, dlouhokřídlí, plameňáci, potáplice, tučňáci, veslonozí a vrubozobí. Své testy provedla u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Na základě tohoto výzkumu našla a popsala 27 polymorfních mikrosatelitových lokusů, které by mohly být využity při paternitních a příbuzenských studiích (Dvořáková, 2010).

**Tabulka č. 1:** Přehled polymorfních *cross-species* mikrosatelitových lokusů nalezených u 5 až 7 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (Ranochová, 2008; Dvořáková, 2010; Mikulová, 2010).

Řád	Zdrojový druh	Počet lokusů	Počet alel
<b>Brodiví (Ciconiiformes)</b>	Čáp bílý ( <i>Ciconia ciconia</i> )	1	2
	Ibis japonský ( <i>Nipponia nippon</i> )	2	2-4
	Ibis rudý ( <i>Eudocimus ruber</i> )	1	2
	Kolpík malý ( <i>Platalea minor</i> )	1	3
	Kvakoš noční ( <i>Nycticorax nycticorax</i> )	2	2
	Nesyt lesní ( <i>Mycteria americana</i> )	1	3
	Volavka velká ( <i>Ardea heroides</i> )	1	6
	Volavka žlutozobá ( <i>Egretta eulophotes</i> )	1	3
<b>Dlouhokřídlí (Charadriiformes)</b>	Alkounek drobný ( <i>Aethia pygmaea</i> )	1	2
<b>Plameňáci (Phoenicopteriformes)</b>	Plameňák růžový ( <i>Phoenicopterus roseus</i> )	5	2-5
<b>Veslonoží (Pelecaniformes)</b>	Fregatka obecná ( <i>Fregata minor</i> )	1	3
	Kormorán galapážský ( <i>Phalacrocorax harrisi</i> )	1	4
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	5	2-3
	Kormorán velký ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )	1	2
	Pelikán bílý ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	5	2-6
	Pelikán severoamerický ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	3	2-5

**Tabulka č. 1 - pokračování:**

Řád	Zdrojový druh	Počet lokusů	Počet alel
<b>Veslonozí (Pelecaniformes)</b>	Terej červenonohý ( <i>Sula sula</i> )	2	2
	Terej guánový ( <i>Sula variegata</i> )	3	2
	Terej modronohý ( <i>Sula nebouxii</i> )	2	2

### 3.3.6 *Cross-species* mikrosatelity nalezené u pelikána kadeřavého

Žádný vědecký tým se dosud nezabýval nalezením mikrosatelitů pro druh pelikán kadeřavý metodou *de novo* odvození z DNA. Veškeré práce věnující se tomuto druhu využívaly *cross-species* PCR amplifikaci s primery odvozenými od jiných druhů ptáků. V níže uvedených bakalářských a diplomových pracích bylo celkem objeveno 20 polymorfních mikrosatelitových lokusů u pelikána kadeřavého. Přehled informací o těchto mikrosatelitech je uveden v tabulce č. 2.

Adéla Ranochová ve své diplomové práci u pelikána kadeřavého analyzovala stejný soubor 62 párů primerů, který použila u pelikána afrického. Testované páry primerů byly navrženy k amplifikaci mikrosatelitových oblastí u zástupců ze 3 řádů: brodiví, potápky a veslonozí. Na základě testování DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého autorka objevila a popsala 2 polymorfní mikrosatelitové lokusy: Ah536 a WSμ20. Stejně jako u pelikána afrického se mikrosatelit WSμ20 ukázal nevhodný pro další využití při určování rodičovství z důvodu výskytu nulových alel v homozygotním stavu u více než 50 % jedinců (Ranochová, 2008).

Navazující výzkum Veroniky Mikulové byl zaměřen na testování stejných 58 párů primerů, které rovněž použila k amplifikaci mikrosatelitových lokusů u pelikána afrického. Použité páry primerů byly původně popsány u 3 ptačích řádů: brodiví, plameňáci a veslonozí. Kromě nich byl testován i jeden pár primerů odvozený od pratura indického z řádu sudokopytníci. Výsledkem *cross-species* PCR amplifikace DNA 5 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého s těmito primery bylo nalezení a popsání 9 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Mikulová, 2010).

Ve své souběžně probíhající bakalářské práci jsem u pelikána kadeřavého zkoumala dalších 223 párů primerů navržených k amplifikaci mikrosatelitových oblastí u zástupců

7 ptačích řádů: brodiví, dlouhokřídlí, plameňáci, potáplice, tučňáci, veslonozí, a vrubozobí. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého jsem našla a charakterizovala soubor 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů potenciálně vhodných pro určování paternit nebo tvorbu rodokmenů (Chmelařová, 2010).

**Tabulka č. 2:** Přehled polymorfních *cross-species* mikrosatelitových lokusů nalezených u 5 až 6 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého (Ranochová, 2008; Chmelařová, 2010; Mikulová, 2010).

Řád	Zdrojový druh	Počet lokusů	Počet alel
<b>Brodiví (Ciconiiformes)</b>	Ibis japonský ( <i>Nipponia nippon</i> )	1	2
	Nesyt lesní ( <i>Mycteria americana</i> )	1	2
	Volavka velká ( <i>Ardea herodias</i> )	1	4
	Volavka žlutozobá ( <i>Egretta eulophotes</i> )	1	2
<b>Dlouhokřídlí (Charadriiformes)</b>	Alkounek drobný ( <i>Aethia pygmaea</i> )	1	2
<b>Plameňáci (Phoenicopteriformes)</b>	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopterus ruber</i> )	1	2
	Plameňák růžový ( <i>Phoenicopterus roseus</i> )	3	2-4
<b>Veslonozí (Pelecaniformes)</b>	Fregatka obecná ( <i>Fregata minor</i> )	2	2-6
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	1	2
	Pelikán bílý ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	3	2
	Pelikán severoamerický ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	4	2-5
	Terej modronohý ( <i>Sula nebovixii</i> )	1	2



### 3.3.7 Nové mikrosatelity vhodné pro testování u pelikánů

V současné době nejsou známy další výzkumy věnující se hledání polymorfních mikrosatelitů pro pelikána afrického a pelikána kadeřavého. Jeví se tedy jako vhodné využít metodou *cross-species* PCR amplifikace k otestování mikrosatelitových lokusů, které byly publikovány po dokončení bakalářských a diplomových prací zabývajících se těmito druhy pelikánů (Ranochová, 2008; Dvořáková, 2010; Chmelařová, 2010; Mikulová, 2010). Z výsledků těchto prací se lze domnívat, že hledání nových polymorfních mikrosatelitů bude úspěšné, pokud při něm budou využity primery odvozené od zástupců řádů brodiví, plameňáci a veslonozí.

#### 3.3.7.1 Nové mikrosatelity od druhů z řádu brodiví

Nově popsané polymorfní mikrosatelitové lokusy odvozené od zástupců řádu brodiví byly publikovány u čápa východního z čeledi čápovití a volavky červenavé (*Egretta rufescens*) z čeledi volavkovití.

Wang *et al.* (2011) ve své studii popsali 11 nových polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa východního. Použili celkem 23 vzorků DNA získaných z tkáně uhynulých jedinců nebo krve odebrané jedincům žijícím ve volné přírodě.

Autoři Hill *et Green* (2010) publikovali 12 nových polymorfních lokusů u volavky červenavé. V rámci výzkumu testovali vzorky DNA 31 jedinců tohoto druhu z hnízdních kolonií v Texasu.

#### 3.3.7.2 Nové mikrosatelity od druhů z řádu veslonozí

Nově nalezené mikrosatelity u řádu veslonozí byly odvozeny z DNA jedinců faetona žlutozobého z čeledi faetonovití a kormorána chocholatého z čeledi kormoránovití.

U faetona žlutozobého bylo popsáno 11 nových polymorfních mikrosatelitů. Autoři Humeau *et al.* (2010) k testování využili celkovou DNA z mrtvého jedince nalezeného v roce 2006 na Reunion Island v Indickém oceánu.

Dalším zástupcem řádu veslonozí, pro nějž byly v nedávné době odvozeny mikrosatelity, byl kormorán chocholatý. Na základě testování 40 jedinců ze dvou různých lokalit (20 z Korsiky, 20 z jihovýchodního Skotska) našli celkem 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Polovina nalezených lokusů měla dinukleotidové repetice, polovina tetranukleotidové (Barlow *et al.*, 2010).

Emily Barlow 6 polymorfních mikrosatelitů nepublikovala, protože se jí zdály obtížně hodnotitelné nebo se u nich vyskytovalo velké procento nulových alel. Sekvence těchto lokusů ale byly vloženy do databáze EMBL, z níž jsme získali potřebné informace pro navržení primerů, které je budou amplifikovat (Barlow, nepublikovaná data).

Přehled všech nových mikrosatelitů vhodných pro testování polymorfizmu u pelikána afrického a pelikána kadeřavého v rámci této diplomové práce je uveden v tabulce č. 3.

**Tabulka č. 3:** Přehled nově popsaných mikrosatelitových lokusů testovaných u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického a pelikána kadeřavého. Jednotlivé sloupce uvádějí: řád, zdrojový druh, názvy příslušných mikrosatelitových lokusů, autora a rok publikace.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitové lokusy	Autor, rok publikace
<b>Brodiví (Ciconiiformes)</b>	Čáp východní ( <i>Ciconia boyciana</i> )	Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168, Cbo235	Wang <i>et al.</i> (2011)
	Volavka červenavá ( <i>Egretta rufescens</i> )	Er21, Er22, Er23, Er24, Er31, Er41, Er42, Er43, Er44, Er45, Er46, Er51	Hill <i>et Green</i> (2010)
<b>Veslonoží (Pelecaniformes)</b>	Faeton žlutozobý ( <i>Phaethon lepturus</i> )	P3A3, P3A4, P3C1, P3D7, P3F3, P3F5, P3F7, P3G12, P3H10, P4F2, P4G1	Humeau <i>et al.</i> (2010)
	Kormorán chocholatý ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> )	Phaari01, Phaari02, Phaari03, Phaari05, Phaari06, Phaari08, Phaari11, Phaari12, Phaari14, Phaari16	Barlow <i>et al.</i> (2010)
		Phaari04, Phaari07, Phaari09, Phaari13, Phaari15, Phaari17	Emily Barlow, nepublikovaná data

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Pro tuto diplomovou práci byly použity vzorky krve jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) a pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) chovaných v ZOO Dvůr Králové, ZOO Plzeň a ZOO Salzburg. Krev o objemu 20-100  $\mu$ l byla jednorázovou sterilní injekční jehlou odebrána z tarzální žíly ptáků, smíchána s 1 ml Queen's pufru (Seutin *et al.*, 1991) a uchována v chladničce při 4 °C.

DNA ze vzorků krve byla vyizolována fenol-chloroformovou metodou dle Maniatis *et al.* (1982) upravenou pro podmínky Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci. Celý postup izolace je podrobně rozepsán v mé bakalářské práci (Chmelařová, 2010).

Vysušená DNA byla rozpuštěna v 500  $\mu$ l TE pufru a po fluorometrickém stanovení koncentrace byl roztok DNA zmražen na -20 °C. Část byla odebrána pro použití při PCR, naředěna deionizovanou vodou na koncentraci 10-50  $\mu$ g/ml a uchována v chladničce při 4 °C.

### 4.2 Metody

#### 4.2.1 PCR amplifikace mikrosatelitové DNA

Reakční směs podle níže uvedeného rozpisu byla napipetována do 1,5ml mikrozkušavek. Jednotlivé mikrozkušavky byly řádně zvortexovány a krátce centrifugovány. Do PCR stripů byla nejprve po 1  $\mu$ l rozpipetována genomická DNA o koncentraci 10-50  $\mu$ g/ml, k ní bylo přidáno 9  $\mu$ l reakční směsi. Takto připravené vzorky byly umístěny do termocykléru, v němž probíhala vlastní PCR reakce podle určených podmínek. Nově testované lokusy uvedené v tabulce č. 3 byly nejprve amplifikovány při základní teplotě nasedání primerů 50 °C. Tato teplota byla u polymorfních lokusů následně upravována za účelem dosažení optimálních výsledků.

Základní podmínky PCR reakce:

5 min:	94 °C	} 35 cyklů
30 s:	94 °C	
30 s:	50 °C nebo dle tabulek v kapitole Výsledky	
30 s:	72 °C	
7 min:	72 °C	

Složení PCR reakční směsi s *Taq* DNA polymerázou pro 6 vzorků včetně zahrnutých ztrát při pipetování:

Storage Buffer A (50 mmol/l Tris-HCl, pH 8, 100 mmol/l NaCl, 0,1 mol/l Na <sub>2</sub> EDTA, 1 mmol/l DTT, 50% glycerol, 1% Triton X-100) (10x)	6,7 µl
roztok MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	4,0 µl
roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7 µl
primer F (10 µmol/l)	3,3 µl
primer R (10 µmol/l)	3,3 µl
<i>Taq</i> DNA polymeráza (2 U/µl)	1,0 µl
deionizovaná voda	44,4 µl

Lokusy, jejichž amplifikace s *Taq* DNA polymerázou poskytovala i po teplotní optimalizaci nehodnotitelné polymorfní produkty, byly rovněž testovány s *Pfu* DNA polymerázou. Rozpis reakční směsi pro tuto polymerázou je uveden níže.

Složení PCR reakční směsi s *Pfu* DNA polymerázou pro 6 vzorků včetně zahrnutých ztrát při pipetování:

<i>Pfu</i> Buffer (200 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8, 100 mmol/l KCl, 100 mmol/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20 mmol/l MgSO <sub>4</sub> , 1mg/ml BSA, 1% Triton X-100) (10x)	6,7 µl
roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7 µl
primer F (10 µmol/l)	3,3 µl
primer R (10 µmol/l)	3,3 µl
<i>Pfu</i> DNA polymeráza (1 U/µl)	2,0 µl
deionizovaná voda	45,0 µl

Polymorfní mikrosatelitové lokusy, jejichž amplifikace s *Pfu* DNA polymerázou neposkytla dobře hodnotitelné produkty, byly dále testovány s *Taq* DNA polymerázou a poloviční koncentrací MgCl<sub>2</sub> v reakční směsi. Rozpis této reakční směsi je uveden níže.

Složení PCR reakční směsi s *Taq* DNA polymerázou a poloviční koncentrací  $MgCl_2$  pro 6 vzorků včetně zahrnutých ztrát při pipetování:

Storage Buffer A (50 mmol/l Tris-HCl, pH 8, 100 mmol/l NaCl, 0,1 mol/l $Na_2EDTA$ , 1 mmol/l DTT, 50% glycerol, 1% Triton X-100) (10x)	6,7 $\mu$ l
roztok $MgCl_2$ (25 mmol/l)	2,0 $\mu$ l
roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7 $\mu$ l
primer F (10 $\mu$ mol/l)	3,3 $\mu$ l
primer R (10 $\mu$ mol/l)	3,3 $\mu$ l
<i>Taq</i> DNA polymeráza (2 U/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
deionizovaná voda	46,4 $\mu$ l

#### 4.2.2 Zpracování PCR produktů

PCR produkty byly separovány v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek. Následující postup byl optimalizován pro použití vyhřívané sekvenční elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra s tloušťkou gelu 0,4 mm a rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm.

1. Obě skla byla řádně omyta, opláchnuta deionizovanou vodou a dočištěna 96% ethanolem. Větší sklo bylo na ploše, která se dotýká gelu, ošetřeno přípravkem odpuzujícím vodu. Po zaschnutí přípravku bylo sklo omyto deionizovanou vodou a osušeno. Menší sklo bylo na ploše, která se dotýká gelu, ošetřeno roztokem molekulárního lepidla. Po zaschnutí lepidla bylo sklo čtyřikrát omyto 96% ethanolem a osušeno. Na ošetřenou plochu většího skla byly po stranách položeny dva 0,4 mm silné spacers. Na spacers bylo ošetřenou plochou umístěno menší sklo. Po zafixování obou skel svorkami tak vznikl prostor pro nalití gelu.
2. Gel byl připraven smícháním všech složek uvedených v rozpisu v kapitole Použité roztoky a opatrně nalit mezi skla tak, aby nedošlo ke vzniku vzduchových bublin. Do místa, kde probíhalo plnění gelem, byl zasunut hřebínek rovnou stranou cca 0,5 cm hluboko. Hřebínek byl rovněž zafixován svorkami a gel ponechán polymerizovat minimálně po dobu 50 minut.
3. Po zpolymerování gelu a odstranění svorek byly ze skel omyty zbytky gelu. Skla byla osušena a pomocí šroubů upevněna do elektroforetické komůrky. Prostory elektrod byly zality 0,5x TBE pufrem, hřebínek odstraněn a vzniklý prostor mezi skly vyčištěn injekční stříkačkou s pufrem. Gel byl přibližně 35 minut předehříván

při výkonu 90 W a maximálních hodnotách elektrického proudu a napětí (150 mA, 3000 V). PCR produkty byly mezitím smíchány s 5  $\mu$ l nanášecího pufru a denaturovány v termocykléru po dobu 3 minut. Denaturované vzorky byly ochlazeny v ledové tříšti, aby se zabránilo renaturaci.

4. Po předehrání gelu byl prostor mezi skly řádně promyt pufrům z injekční stříkačky a nasazen hřebínek zoubky cca 1 mm hluboko do gelu. PCR produkty smíchané s nanášecím pufrům byly po 2  $\mu$ l napipetovány do mezer mezi zoubky hřebínku. Vzorky byly separovány při výkonu 70 W a maximálních hodnotách elektrického proudu a napětí (150 mA, 3000 V). Doba separace PCR produktů byla optimalizována v závislosti na jejich molekulové hmotnosti.
5. Po uplynutí doby elektroforetické separace byla skla vyjmuta z elektroforetické komůrky a opláchnuta deionizovanou vodou. Spacery a hřebínek byly odstraněny a skla opatrně oddělena nožem. Následující kroky byly provedeny na třepačce v digestoři.
  - Menší sklo s gelem (dále jen gel) bylo umístěno do fotomisky a zalito fix/stop roztokem. Fix/stop roztok byl po 20 minutách působení slit zpět do baňky a gel třikrát promyt v deionizované vodě.
  - Gel byl zalit roztokem  $\text{HNO}_3$ . Po 5 minut působení byl roztok slit a gel čtyřikrát promyt v deionizované vodě.
  - Gel byl zalit roztokem  $\text{AgNO}_3$ . Po 30 minutách působení byl roztok slit a gel opláchnut v deionizované vodě.
  - Gel byl zalit vychlazeným roztokem vývojky, v němž došlo k vizualizaci hnědočerných proužků PCR produktů. Když byly proužky dostatečně zřetelné, byl proces vizualizace zastaven přilítím fix/stop roztoku .
  - Gel byl opláchnut v deionizované vodě a ponechán v sušárně při 60 °C. přibližně 30 minut.
6. Po vyhodnocení výsledků byl elektroforetogram naskenován. Sklo s již nepotřebným gelem bylo ponořeno do roztoku NaOH, v němž se gel po několika desítkách minut odlepil od skla.

### 4.2.3 Statistické vyhodnocení výsledků

Všechny polymorfní mikrosatelitové lokusy u obou druhů pelikánů byly dále charakterizovány na základě zpracování dvěma populačně-genetickými programy, Cervus a Genepop.

Pro zpracování výsledků této diplomové práce byla použita verze Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007) a webová verze programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008). Program Cervus uživateli umožňuje stanovit očekávanou heterozygotnost, přítomnost nulových alel a zda jsou lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze. Rovněž udává spolehlivost při určování rodičovství a příbuzenských vztahů mezi jedinci. Program Genepop slouží k určení vazebného spojení mezi lokusy.

### 4.3 Použité chemikálie

- Akrylamid (AppliChem)
- *Taq* DNA polymeráza (2U/ $\mu$ l) \*
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400  $\mu$ l každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (AppliChem)
- Ethanol – 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na<sub>2</sub>EDTA) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hoechst, No. 33258 (Sigma)
- 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'-metylenbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N' - tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- *Pfu* DNA polymeráza (1U/μl) \*
- Proteináza K (Sigma)
- Clear Vue, Rain Repellent (Turtle WAX)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

\* - Obě DNA polymerázy byly připraveny v naší laboratoři. Plazmidy nesoucí gen pro produkci enzymu *Taq* DNA polymerázy a *Pfu* DNA polymerázy, které spadají pod patentovou ochranu, byly získány legálním způsobem od společnosti ADDGENE. Tato nezisková společnost slouží jako depozitář plazmidů. Využití většiny plazmidů z této sbírky pro nekomerční vědecké a výukové účely (tedy i plazmidu nesoucího gen pro produkci enzymu *Taq* DNA polymerázy a *Pfu* DNA polymerázy) je povoleno na základě UBMTA (Uniform Biological Materials Transfer Agreement), odstavce II., článku 3 a).

#### 4.4 Použité roztoky

##### **Fix/stop roztok:**

K 800 ml deionizované vody přidat 88 ml ledové kyseliny octové.

##### **Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:**

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



**Polyakrylamidový 6% gel:**

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 40 µl N, N, N', N'- tetramethylethyldiaminu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

**Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného:**

0,8 g AgNO<sub>3</sub> rozpustit v 800 ml deionizované vody. Uchovávat v chladničce, před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu.

**Roztok 1% kyseliny dusičné:**

K 800 ml deionizované vody přidat 12 ml 65% HNO<sub>3</sub>.

**Roztok 10% peroxodisíranu amonného:**

1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> rozpustit v 10 ml deionizované vody. Uchovávat v chladničce.

**Roztok hydroxidu sodného 1 mol/l:**

40 g NaOH rozpustit v 800 ml deionizované vody, objem doplnit na 1 l.

**Roztok molekulárního lepidla:**

K 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu přidat 3 µl 3-methakryloxypropyl-trimethoxysilanu.

**TE pufr:**

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 200 µl zásobního roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0

Rozpustit v 900 ml deionizované vody, objem doplnit na 1 l a zfiltrvat.

**Vývojka:**

24 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> rozpustit v 800 ml deionizované vody. Umístit do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než 10 °C. Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

**Zásobní roztok 6% akrylamidu:**

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml zásobního 40% roztoku akrylamid : N, N'- methylenbisakrylamid 19:1

Po rozpuštění všech složek zfiltrvat a uložit v temné lahvi v chladničce.

### **Zásobní 40% roztok akrylamidu : N,N'- methylenbisakrylamidu 19 : 1**

- 380 g akrylamidu
- 20 g N,N'- methylenbisakrylamidu

Rozpustit v 500 ml deionizované vody, objem doplnit na 1 l a uložit v temné lahvi v chladničce.

### **Zásobní roztok 10x TBE pufaru:**

- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 55 g kyseliny borité  $H_3BO_3$
- 40 ml roztoku  $Na_2EDTA$  0,5 mol/l, pH 8,0

Rozpustit v 800 ml deionizované vody, objem doplnit na 1 l.

## **4.5 Laboratorní přístroje**

Elektroforetický zdroj:	EV232 (Consort)
Chladnička kombinovaná:	Infiniti (Whirlpool)
Laboratorní váhy:	Mark S622 (BEL Engineering)
Magnetická míchačka:	MR Hei-Combi (Heidolph)
Mikropipety:	Finnpipette 0,5 až 10 $\mu$ l (osmikanálová) a 0,3 $\mu$ l až 1 ml (ThermoLabsystem) Nichpipet EX 0,5 $\mu$ l až 1 ml (Nichiryo)
Minicentrifuga:	CLE CSQSP (Cleaver Scientific Ltd)
Negatoskop:	NEGA1 (Maneko)
Sekvenační elektroforetická komůrka:	S2 (Whatman Biometra)
Sušárna:	CAT 8050 (Contherm)
Temperovaný blok:	Accu Block <sup>TM</sup> , Digital Dry Bath (Labnet)
Termocyklér:	GenePro (BIOER technology) PTC 100-96 VHB (MJ Research, Inc.) XP Thermal Cyclor (BIOER technology)
Třepačka:	Orbit 1 900 (Labnet International)
Vortex:	MS2 Minishaker (Ika)
Výrobník deionizované a ultračisté vody:	typ 02 (AquaOsmotic)
Výrobník ledu:	Icematic F100 Compact (Castel Mac)

## **5 Výsledky**























































## **6 Diskuze**























## 7 Závěr

Ve své práci jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace otestovala u šesti nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) a šesti nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého (*P. crispus*) polymorfismus 47 mikrosatelitů odvozených od zástupců řádů brodiví (Ciconiiformes) a veslonozí (Pelecaniformes). Nalezla jsem 3 polymorfní mikrosatelitové lokusy u pelikána afrického, u pelikána kadeřavého jsem nezjistila žádný polymorfní lokus.

U stejného souboru nepříbuzných jedinců obou druhů pelikánů jsem znovu testovala amplifikaci 77 mikrosatelitových lokusů, které byly v předchozích bakalářských pracích (Dvořáková, 2010; Chmelařová, 2010) a diplomových pracích (Ranochová, 2008; Mikulová, 2010) označeny jako nepolymorfní. Tyto lokusy však poskytovaly polymorfní produkty u pelikána bílého (*P. onocrotalus*) nebo skvrnozobého (*P. philippensis*). Objevila jsem 9 polymorfních mikrosatelitů u pelikána afrického a 6 polymorfních mikrosatelitů (resp. 7 polymorfních lokusů) u pelikána kadeřavého.

Se všemi polymorfními mikrosatelity jsem provedla genotypizaci u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického a 41 jedinců pelikána kadeřavého. Na základě genotypizační analýzy jsem vyřadila 3 nepolymorfní lokusy u pelikána afrického a 2 nepolymorfní lokusy u pelikána kadeřavého, které měly mít podle předchozích bakalářských a diplomových prací 2 alely.

Nalezla jsem celkem 51 polymorfních mikrosatelitů, respektive 51 polymorfních mikrosatelitových lokusů u pelikána afrického a 23 polymorfních mikrosatelitů, respektive 24 polymorfních mikrosatelitových lokusů u pelikána kadeřavého. Data získaná z genotypizační analýzy těchto polymorfních mikrosatelitových lokusů jsem zapracovala statistickými programy Cervus 3.0.3 a Genepop 4.1.

Podle statistických charakteristik jsem vybrala soubory 5 mikrosatelitů u pelikána afrického a 4 mikrosatelitů u pelikána kadeřavého vhodné pro paternitní analýzy u těchto druhů pelikánů.

Na základě genotypizační analýzy 41 jedinců pelikána kadeřavého jsem ověřila příbuzenské vztahy v chovné skupině tohoto druhu v ZOO Dvůr Králové.

## 8 Seznam zkratk

A	adenin
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EST	místo s expresní adresou ( <i>expressed sequence tag</i> )
G	guanin
H <sub>Exp</sub>	očekávaná heterozygotnost ( <i>expected heterozygosity</i> )
H <sub>Obs</sub>	pozorovaná heterozygotnost ( <i>observed heterozygosity</i> )
IUCN	Mezinárodní unie pro ochranu přírody ( <i>International Union for Conservation of Nature</i> )
PIC	vypovídací hodnota mikrosatelitu ( <i>polymorphism information content</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
T	tymin
T <sub>a</sub>	teplota nasedání primerů ( <i>annealing temperature</i> )
UTRs	netranslatované sekvence ( <i>untranslated regions</i> )



## 9 Použitá literatura

- Anmarkrud JA, Kleven O, Bachmann L, Lifjeld JT (2008): Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus *HrU10*. *BMC Evolutionary Biology* 8, 138.
- Anonymous (2012a): BirdLife International 2012. *Pelecanus thagus*. www.birdlife.org. Navštíveno dne 7. března 2012.
- Anonymous (2012b): BirdLife International 2009. *Pelecanus rufescens*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. www.iucnredlist.org. Navštíveno dne 7. března 2012.
- Anonymous (2012c): BirdLife International 2008. *Pelecanus crispus*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. www.iucnredlist.org. Navštíveno dne 7. března 2012.
- Alderton D (1995): Ptáci. Překlad z anglického originálu. Nakladatelský dům OP, Praha, 108 s.
- Barlow EJ, Telford A., Daunt F, Cavers S (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*, **preprint**.
- Brown LH, Urban EK, Newman K (1982): The birds of Africa. Vol. 1, Academic Press, London, 521 s.
- Buržáková K (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Cracraft J, Barker FK, Braun M, Harshman J, Dyke GJ, Feinstein J, Stanley S, Cibois A, Schikler P, Beresford P, García-Moreno J, Sorenson MD, Yuri T, Mindell DP (2004): Phylogenetic relationships among modern birds (Neornithes): toward an avian tree of life. In: J. Cracraft *et* M. J. Donoghue (Eds.): Assembling the tree of life. Oxford University Press, New York, 468–489.
- Dawson DA, Burke T, Hansson B, Pandhal J, Hale MC, Hinten GN, Slate J (2006): A predicted microsatellite map of the passerine genome based on chicken-passerine sequence similarity. *Molecular Ecology* 15 (5), 1299–1320.
- Dawson DA, Horsburgh GJ, Küpper C, Stewart IRK, Ball AD, Durrant KL, Hansson B, Bacon I, Bird S, Klein Á, Lee J-W, Martín-Gálvez D, Simeoni M, Smith G, Spurgin LG, Burke T (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources* 10 (3), 475–494.
- Dawson DA, Hunter FM, Pandhal J, Buckland R, Parham A, Jones IL, 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 (2), 289-297.
- Dearborn DC, Hailer F, Fleisches RC (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* 8 (6), 1399-1401.
- del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona, 696 s.
- de Ponte Machado M, Feldheim KA, Sellas AB, Bowie, RCK (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 (4), 1033-1036.
- Duffie C, Glenn TSC, Hagen C, Parker P (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources* 8 (3), 625–627
- Dungel J, Hudec K (2001): Atlas ptáků české a slovenské republiky, 1. vydání. Academia, Praha, 249 s.
- 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).
- Ericson PGP, Anderson CL, Britton T, Elzanowski A, Johansson US, Källersjö M, Ohlson JI, Parsons TJ, Zuccon D, Mayr G (2006): Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters* 2 (4): 543–547.
- Fain MG, Houde P (2004): Parallel radiations in the primary clades of birds. *Evolution* 58 (11): 2558–2573.
- Fike JA, Devault TL, Rhoades OE (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* 9 (4), 1183-1185.
- Galbusera P, van Dongen S, Matthysen E (2000): *Cross-species* amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1 (2), 163–168.
- Geraci J, Gaillard M, Bechnet A, Cezilly F, Wattier RA (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, **preprint**.
- Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, Braun MJ, Chojnowski JL, Cox WA, Han K-L, Harshman J, Huddleston CJ, Marks BD, Miglia KJ, Moore WS, Sheldon FH, Steadman DW, Witt CC, Yuri T (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* 320 (5884), 1763-1768.
- Hancock JM (1999): Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein D, Schlötterer C (Eds.): Microsatellites: Evolution and applications. Oxford University Press, New York, 352 s.

- Hanzák J, Hudec K (1974): Světem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci. Albatros, Praha, 497 s.
- Harshman J (1994): Reweaving the tapestry: what can we learn from Sibley and Ahlquist (1990)? *Auk* 111 (2), 377-388.
- 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 (1), 157-160.
- Hickman CR, Peters MB, Crawford NG, Hagen C, Glenn TC, Somers CM (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* 8 (6), 1439-1441.
- Hill A, Green MC (2010): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* 3 (1), 13-15.
- Huang Y, Zhou L (2011): Screening and application of microsatellite markers for genetic diversity analysis of Oriental White Stork (*Ciconia boyciana*). *Chinese Birds* 2 (1), 33-38.
- 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* 11 (3), 1211-1214.
- Humeau L, da Silva D, Guérin F, Jaquement S, Requier J-B, le Corne M (2010): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Pheathon lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources*, **preprint**.
- 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 lower reaches of Yangtze River. *Acta Zoologica Sinica* 51 (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 (5), 1537-1540.
- 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 Ch-Q, Zhang D-X (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4 (4), 615-617.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007): Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16 (5), 1099-1106.

- Kapil, R. (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations. Doctoral Thesis. University of North Texas, USA. Published online (www.unt.edu). Navštíveno dne 13. března 2012.
- 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* 99 (6), 688-693.
- Kovalik P, Pačenovský S, Čapek M, Topercer J (2010): Slovenské mená vtákov sveta. SOS/BirdLife Slovensko, Bratislava. Aktualizováno pro rok 2011.
- 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 (4), 650-656.
- 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 (2), 224-227.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982): Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Mayr G, Manegold A, Johansson US (2003). Monophyletic groups within ‘‘higher land birds’’: comparison of morphological and molecular data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 41 (4), 233-248.
- Mayr G (2008): 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 (1), 63-72.
- McGuire HL, Noor MAF (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes* 2 (2), 170-172.
- Mikulová V (2008): Studium paternity u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Mikulová V (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Morris-Pocock JA, Taylor SA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources*, **preprint**.
- Nádvořník 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.
- Nelson JB (2005): Pelicans, Cormorants, and their Relatives. The Pelecaniformes, 1st ed. Oxford University Press, Oxford, 661 s.

- Piertney SB, Goostrey A, Dallas JF, Carss DN (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology* 7 (1), 138-140.
- Preston EL (2005): Isolation and Characterization of Polymorphic Loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New Tools for Wildlife Management. Ph.D. dissertation, University of North Texas, USA.
- Primmer CR, Möller AP, Ellegren H (1996): A wide-range survey of *cross-species* microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5 (3), 365–378.
- Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merilä J (2005): Factors affecting avian *cross-species* microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36 (4), 348-360.
- Ranochová A (2006): Studium paternity u pelikánů (*Pelecanus* sp.) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Zoologie PřF UP v Olomouci).
- Ranochová A (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Rousset F (2008): GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8 (1), 103-106.
- Santos MS, Concalves EC, Barbosa MSR, Silva A, Schneider MPC (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* — Threskiornithidae-Aves). *Molecular Ecology Notes* 6 (2), 307–309.
- Seutin G, White BN, Boag PT (1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* (69), 82-90.
- 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 (5), 1525-1528.
- Schreiber EA (1994): Pelikáni a jejich příbuzní. In: Homolová Š (Ed.): Obratlovci: savci, ptáci, obojživelníci, plazi: encyklopedický průvodce světem zvířat, 1. vydání. Nakladatelský dům OP, Praha, 687 s.
- Sibley CG, Ahlquist JE, Monroe BL (1988): A Classification of the Living Birds of the World Based on Dna-Dna Hybridization Studies. *Auk* 105 (3), 409-423.
- Sibley CG, Ahlquist JE (1990): Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution. Yale University Press, New Haven.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (1998): Svět zvířat IV. Ptáci 1. Albatros, Praha, 143 s.
- Taylor SA, Morris-Pocock JA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151 (2), 525-528.

- Tomasulo-Seccomandi AM, Schable NA, Bryan AL Jr, Brisbin IL Jr, del Lama SN, Glenn TC (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3 (4), 563-566.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10 (7), 967-981.
- Van Tuinen M, Sibley CG, Hedges SB (2000): The early history of modern birds inferred from DNA sequences of nuclear and mitochondrial ribosomal genes. *Molecular Biology and Evolution* 17 (3), 451–457.
- 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* 28 (8) , 606-608.
- Wilson R (2008): Sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) – Modern symplex. Summer studentship 2007/2008. Massey University, Albany.
- Yeung CKL, Hsu Y-C, Yao C-T, Li S-H (2008): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics* 10 (4), 1081-1084.

## **10 Přílohy**









