

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalárska práca

Olomouc 2014

Alexandra Pechová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci
a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta
indomalajského (*Mycteria leucocephala*)**

Bakalárska práca

Alexandra Pechová

Študijný program: Biologie

Študijný obor: Biologie-Geologie a ochrana životního prostředí

Forma štúdia: Prezenčná

Olomouc 2014

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

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

V Olomouci dňa

.....

Chcela by som poďakovať vedúcemu práce RNDr. Petrovi Nádvorníkovi, Ph.D. za prejavenu dôveru, trpezlivosť, odborné rady a pripomienky, ktoré mi poskytol pri vypracovaní tejto bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať neznámemu nálezcovi zaznamenaných výsledkov, bez ktorých by táto práca nemohla byť spracovaná. A v neposlednej rade kolegyniam z Laboratória populačnej genetiky na Katedre bunečnej biológie a genetiky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za rady a príjemne pracovné prostredie.

Súhrn

V tejto bakalárskej práci som sa venovala hľadaniu nových polymorfných mikrosatelitových márkeroch pre myktériu lysohlavú (*Mycteria leucocephala*) za využitia metódy *cross-species* PCR amplifikácie.

V teoretickej časti som sa zaoberala podrobným opisom radu brodivcov (Ciconiiformes) a jeho piatim čeľadím. Podrobnejšie som sa venovala opisu čeľadi bocianovitých kam patrí aj myktéria lysohlavá. Ako ďalšiemu som sa venovala teoretickému spracovaniu repetitívnej DNA z doposiaľ známych literárnych zdrojov. Väčšiu pozornosť som venovala opisu mikrosatelitov, ich deleniu, využitiu, mutáciám, navrhovaniu *de novo* a *cross-species* PCR amplifikácii. V poslednej časti som sa venovala popisu doposiaľ nájdeným polymorfným mikrosatelitovým lokusom u radu tučniakov, brodivcov, potápiek, konzervovaným vtáčím mikrosatelitom, EST mikrosatelitom a metódam ich vyhľadávania.

V experimentálnej časti tejto bakalárskej práce som sa zaoberala vyhľadávaním polymorfných mikrosatelitových lokusov s využitím metódy *cross-species* PCR amplifikácie na genomickej DNA vyizolovanej zo 6 jedincov myktérie lysohlavej. Za týmto účelom som použila všetky doposiaľ známe mikrosatelity navrhnuté pre rad tučniaky, niekoľko mikrosatelitov z radu brodivce a potápiek, EST mikrosatelity a konzervované vtáče mikrosatelity.

Experimentálnymi metódami som zistila u myktérie lysohlavej 17 nezávislých polymorfných mikrosatelitov z testovaných 169 párov primerov. Z toho bolo 5 mikrosatelitov odvodených z radu tučniaky, 4 mikrosatelity odvodené z radu brodivce a 1 mikrosatelit odvodený od radu potápiek. Z konzervovaných vtáčích mikrosatelitov vykazovali polymorfizmus 3 mikrosatelity a 1 mikrosatelit z EST sekvencií. Počet alel sa pohyboval od 2 do 5.

Summary

I dedicated this thesis to a search of new polymorphic microsatellite markers for painted stork (*Mycteria leucocephala*), using the method of cross-species PCR amplification.

In the theoretical part I dealt with a detailed description of a Ciconiiformes and its five families. More detailed, I described the stork family that includes also painted stork. Furthermore, I dealt with theoretical elaboration of repetitive DNA using literary sources known so far. I paid more attention to the description of microsatellites, their division, utilization, mutations and proposition of de novo and cross-species PCR amplification. In the last part, I described polymorphic microsatellite loci founded so far within the order of Sphenisciformes, Ciconiiformes, Podicipediformes, conserved avian microsatellites, EST microsatellites and their search methods.

In the experimental part of the thesis, I dealt with a search of polymorphic microsatellite loci, using the method of cross-species PCR amplification on isolated genomic DNA from 6 painted storks. For this purpose I used all know microsatellites proposed for the order of Sphenisciformes, few microsatellites from the order of Ciconiiformes and Podicipediformes, EST microsatellites and conserved avian microsatellites.

Using the experimental methods I found 17 independent polymorphic microsatellite loci out of the original 169 pairs of primers for painted stork. Five microsatellites were derived from the order of Sphenisciformes, 4 from the order of Ciconiiformes and 1 from the order of Podicipediformes. Three conserved avian microsatellites showed polymorphism and one was with EST sequence. The number of alleles varied from 2 to 5.

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Úvod | 8 |
| 2 | Ciele práce | 9 |
| 3 | Literárny prehľad | 10 |
| 3.1 | Rad brodivce | 10 |
| 3.1.1 | Čeľad' volavkovité | 12 |
| 3.1.2 | Čeľad' takatrovité | 12 |
| 3.1.3 | Čeľad' ibisovité | 13 |
| 3.1.4 | Čeľad' člnozobcovité | 14 |
| 3.1.5 | Čeľad' bocianovité | 14 |
| 3.2 | Repetitívna DNA | 18 |
| 3.2.1 | Satelity | 18 |
| 3.2.2 | Minisatelity | 19 |
| 3.2.3 | Mikrosatelity | 20 |
| 4 | Materiál a metódy | 28 |
| 4.1 | Biologický materiál | 28 |
| 4.2 | PCR amplifikácia mikrosatelitových lokusov | 28 |
| 4.3 | Spracovanie PCR produktov | 31 |
| 4.4 | Použité chemikálie | 34 |
| 4.5 | Použité roztoky | 35 |
| 4.6 | Prístrojové vybavenie laboratória | 37 |
| 5 | Výsledky | 38 |
| 6 | Diskusia | 45 |
| 7 | Záver | 48 |
| 8 | Zoznam skratiek | 49 |
| 9 | Použitá literatúra | 50 |

1 Úvod

Mikrosatelity sa vyskytujú v genómoch prokaryotických aj eukaryotických organizmov. Sú to krátke sekvencie DNA, kde sa vyskytujú opakujúce sa repetice. Ich veľký stupeň polymorfizmu je zabezpečený vysokou mierou mutačnej rýchlosti. Vďaka tejto vlastnosti majú široké využitie. Používajú sa ako genetické markery v štúdiách fylogenetickej príbuznosti, paternity, identifikácie jedincov alebo populačne-genetických štúdiách.

V tejto bakalárskej práci sa budem zaoberať hľadaním polymorfných mikrosatelitových lokusov u 6 jedincov z čeľade bocianovitých a to konkrétne mykterie lysohlavej (*Mycteria leucocephala*). Za týmto účelom budem využívať metódu *cross-species* PCR amplifikácie. Otestovaných bude celkom 169 párov primerov. Využitie budú všetky doposiaľ známe mikrosatelity z radu tučniaky, niekoľko mikrosatelitov z radu potápky a brodivce, EST vtáčie mikrosatelity a konzervované vtáčie mikrosatelity.

2 Ciele práce

1. Zhromaždiť dostupné literárne zdroje.
2. Vypracovať rešerš na tému bakalárskej práce.
3. Vykonať PCR amplifikáciu DNA myktérie lysohlavej (*Mycteria leucocephala*) s využitím *cross-species* primerov. Všetkých doposiaľ známych mikrosatelitov z radu tučniaky, niekoľko mikrosatelitov z radu potápky a brodivce, EST vtáčie mikrosatelity a konzervované vtáčie mikrosatelity.
4. Pri výskyte polymorfných mikrosatelitoch zoptimalizovať ich teplotu *annealingu*, dobu trvania elektroforetickej separácie PCR produktov a vyhodnotiť počet alel.

3 Literárny prehľad

3.1 Rad brodivce

Do radu brodivcov (Ciconiiformes) patrí 5 čeľadí a to konkrétne volavkovité (Ardeidae), takatrovité (Scopidae), ibisovité (Threskionithidae), člnozobcovité (Balaenicipidae) a bocianovité (Ciconiidae). Tieto čeľade zastrešujú 115 druhov vtákov, ktoré sa rozprestierajú takmer po celom svete. Momentálne sa na území Českej republiky a Slovenskej republiky nachádzajú: volavka striebristá taktiež známa aj ako beluša malá (*Egretta garzetta*), volavka popolavá (*Ardea cinerea*), volavka biela nazývaná aj beluša veľká (*Ardea alba*), bučiacik močiarný (*Ixobrychus minutus*), bučiak veľký (*Botaurus stellaris*), a chavkoš nočný (*Nycticorax nycticorax*) z čeľade volavkovitých, z čeľade bocianovitých to je bocian biely (*Ciconia ciconia*) a bocian čierny (*Ciconia nigra*) (Šťastný *et al.*, 2006).

Do tohto radu spadajú stredne veľkí až veľkí vtáci, ktorí majú dlhý zobák, ohybný, úzky krk a dlhé nohy (Hanzák, 1974).

Dlhé nohy majú uspôsobené na brodenie v plytkej vode, prípadne po mäkkej premočenej pôde. Pre tento účel majú tri predné prsty spojené blanami a štvrtý palec slúži na prichytenie v korunách stromov alebo na stebľá rákosia. Ich nohy nie sú uspôsobené na beh, ale na pomalú kráčavú chôdzu, ak sa vyskytnú v ohrození volia odchod vzlietnutím. Takto špecificky prispôsobené končatiny vymedzujú aj oblasti ich výskytu (Hudec *et* Šťastný, 1994).

Rozprestreté krídla vtákov z radu brodivých dosahujú veľkosti až do 2,6 m (Hudec *et* Šťastný, 1994). V čase, keď dochádza k ohrievaniu vzduchu sa tvoria nad pevninou prúdy a práve vďaka týmto prúdom môžu vtáci z tohto radu staticky plachtiť (Gaisler *et* Zima, 2007). Nohy majú pri lete vždy natiahnuté. Krk v závislosti na druhu môžu mať buď prehnutý do tvaru písmena „S“ ako je to u volavkovitých (Hanzák, 1974). Tento tvar má funkčné využitie pri love (Hudec *et* Šťastný, 1994). U bocianovitých a ibisovitých majú vtáci krk natiahnutý rovno pred sebou (Hanzák, 1974). Krčná kostra brodivcov vtákov sa skladá zo 16 - 20 krčných stavcov. U niektorých druhov so špeciálnou úpravou 6. krčného stavca.

Zobák je adaptovaný k lovu tak, aby sa mohli vo veľkej rýchlosti priblížiť ku koristi a lapiť ju (Burnie, 2002). Rovnako ako krk, tak aj tvar zobáku je v závislosti na type potravy a druhu vtáka odlišený. Druhy, ktoré lovia ryby majú zobák prevažne špicatý. U druhov, ktoré sa živia červami a kôrovcami, sa vyskytuje z väčšej časti zobák dlhý a v dolnej časti zahnutý. V love im taktiež napomáha ich skvelý zrak. Okrem vyššie spomínanej potravy, patria do ich jedálneho aj plazy, drobné cicavce, ale aj zvyšky mŕtvych tiel iných živočíchov (Hanzák, 1974; Gaisler *et Zima*, 2007). Aby zvýšili úspešnosť lovu, zháňajú potravu prevažne jednotlivcovo. Naopak za účelom väčšieho bezpečia sa počas spánku zhromažďujú do kolónií (Burnie, 2002).

U väčšiny druhov vtákov z radu brodivcov sa vyskytujú nedostatočne vyvinuté hlasové svaly, prípadne je ich hlasové ústrojenstvo zaostalé. Tieto nedostatky spôsobujú slabý hlasový prejav. Ako náhrada hlasovej komunikácie slúžia klopkavé zvuky vydávané zobákom (Šťastný *et al.*, 1998).

U veľkých druhov sa vyskytuje tuhé a priliehajúce perie, menšie druhy majú naopak mäkké perie. Ozdobné perie sa u niektorých vyskytuje v dobe hniezdenia (Hudec *et Šťastný*, 1994). Mazová žľaza, ktorá je prerastená prachovým perím, sa vyskytuje v oblasti kostrče a je dobre vyvinutá. Pohlavné odlišenie medzi samcami a samicami nie je vo väčšine prípadoch pozorované. Operenie v oblasti krku je riedke (Šťastný *et al.*, 1998).

Mláďatá týchto vtákov po vyliahnutí z vajec vidia a rastú veľkou rýchlosťou (Hudec *et Šťastný*, 1994). Ich potravou v tomto období je natrávená potrava od ich rodičov, ktorým ho priamo kŕmia. V neskoršom veku sa mláďatá kŕmia samy natrávenou potravou, ktorú im do hniezda prinesú rodičia (Gaisler *et Zima*, 2007).

Pri hniezdení vytvárajú počas roka jednotlivé páry alebo sa zoskupujú do kolónií a hniezdia spolu. Veľkosť kolónie môže presahovať až 1000 párov. V takýchto veľkých kolóniách sa zoskupujú páry, ktoré sú tvorené jedincami rozličných druhov. Veľké hniezda si vytvárajú na stromoch, ktoré v prípade zotrvania viacero rokov neustále rekonštruujú a pristavujú. Okrem stromov si vytvárajú hniezda aj v rákosi, tieto hniezda obvykle slúžia len na určité obdobie. Vtáci radu brodivcov, ktorí sa vyskytujú v severných oblastiach, v zimných mesiacoch odlietajú a smerujú do teplejších krajín. Druhy, ktoré sa nachádzajú v južných oblastiach vo väčšine prípadov prezimujú a zotrvávajú na svojich hniezdach (Hudec *et Šťastný*, 1994).

Aj napriek takmer kozmopolitnému rozšíreniu týchto vtákov sa niektoré druhy nachádzajú v tak nízkom počte jedincov, že sú radené medzi ohrozené a kriticky ohrozené druhy. Tieto druhy podliehajú prísnej ochrane a snahe o zväčšenie ich populácie (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.1 Čel'ad' volavkovité

Táto obsiahla čel'ad' zastrešuje vtákov s typickým štíhlym telom. Ich harpúnovitý spôsob lovu umožňuje anatomické tvarovanie krku do tvaru písmena „S“. Toto zakrivenie je spôsobené úpravou 6. krčného stavca, ktorý mu dáva možnosť vystreliť za potravou ako harpúna (Šťastný *et al.*, 1998). Medzi ich obvyklý zdroj potravy patria ryby (Hanzák, 1974). Na tento typ potravy sú uspokojené aj špicatým a úzkym zobákom. Je zaujímavé, že oproti väčšine ostatným brodivcom je u nich vytvorené hlasové ústrojenstvo. Ich hlasové prejavy sú často veľmi silné, čo je spôsobené a sprevádzané aj agresívnym správaním (Hudec, 1994).

Ich kostrčná žľaza, ktorá má slúžiť na premazávanie peria, nie je dostatočne vyvinutá. Na tento účel však slúži prachové perie, ktoré sa rozpadáva a nachádza sa v oblasti kostrče a hrude (Hudec, 1994). Mechanizmus rozpadu prachového peria je v pokrytí obrysového peria, ktoré je tak potom odolné voči vode.

Hniezda si stavajú v blízkosti vody či už v rastlinných porastoch alebo krovinách. Výnimkou nie je ani hniezdenie mimo vody, napríklad v lesoch. V hniezdach menších volaviek sa môže vyskytovať tri až šesť vajec. U druhov, ktoré sú väčšie to môže byť aj 7 vajec. Po vyliahnutí sú mláďatá kŕmené natrávenou potravou, ktorú im priamo do zobáka vkladajú ich rodičia. Starostlivosť rodičov o mláďatá trvá pomerne dlhé obdobie od 6 do 8 týždňov (Hanzák *et* Hudec, 1974). Pri pociťovaní ohrozenia sa stavajú do krycej alebo výstražnej pozície (Hudec, 1972).

3.1.2 Čel'ad' takatrovité

Do tejto čel'ade patrí len jeden rod, ktorý zahŕňa len jeden druh a to konkrétne takatra tmavá (*Scopus umbretta*). Jedná sa o malého nenápadného vtáka, ktorý má

hnedé sfarbenie. Krk má pri lete len z časti ohnutý (Hanzák *et* Hudec, 1974), hlavu má ozdobenú dozadu smerujúcou, širokou a hustou chocholkou. Hlava je zakončená typickým zobákom pre tento druh, zo strán sploštený a pri koreni je vysoký. Kožný lém spája jeho predné prsty na pomerne krátkych nohách (Šťastný *et al.*, 1998).

V prírode sa vyskytuje veľmi zriedkavo v menších spoločenstvách, prirodzenejšie je pre neho vytvárať páry. Hniezda si vytvárajú v blízkosti pomalých vodných tokov na skalách alebo v korunách stromov. Zemepisne je miesto výskytu tohto vtáka určené v oblasti Afriky a juhozápadnej Arábie (Gloser, 1994). Jeho zdroj potravy tvoria prevažne žaby, malí kôrovci, hmyz a ryby (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.3 Čeľaď ibisovité

Vtáci patriaci do tejto čeľade majú stredne veľké telo. Na základe ďalších morfológických a behaviorálnych znakov sa rozdeľuje na podčeľaď Threskiornithinae a podčeľaď Plataleinae.

Do podčeľade Plataleinae patria vtáci s rovným a v prednej časti širším a plochým zobákom. Potravu, malých živočíchov žijúcich vo vodnom prostredí, hľadajú s ponoreným zobákom pripomínajúcim lyžicu (Šťastný *et al.*, 1998). Oblasťou ich výskytu sú močiare.

Naopak zobák u Threskiornithinae je pomerne dlhý a jeho zakončenie je zahnuté. U niektorých druhov sa na krku objavujú holé miesta prípadne záhyby z kože. Samci a samice nie sú odlišené pohlavným dimorfizmom. Perie u mláďat je matné (Šťastný *et al.*, 1998). Na dlhých nohách majú štyri prsty, na predných troch je spojovacia blana, ktorá im umožňuje lepší pohyb v bažinatých a močiarných oblastiach (Hanzák *et* Hudec, 1963). V tomto prostredí je dostatok vodného hmyzu, kôrovcov, rýb, žiab či mäkkýšov čo tvorí aj základ jeho potravy (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.4 Čel'ad' člnozobcovité

Čel'ad' člnozobcovité zastrešuje len jeden rod, do ktorého patrí len jeden druh a to člnozobec veľký (*Balaeniceps rex*). Výskyt tohto druhu je v častiach Afriky s tropickým podnebíom ako napríklad v Ugande, Kongu a taktiež ho možno nájsť na povodí Bieleho Nílu. Najčastejší výskyt člnozobcov je individuálne, občas vytvárajú páry (Gloser, 1994). Hniezda, dosahujúce výšku až 1 m, si tvorí z vetvičiek a rákosia v bažinatých oblastiach. Do nich kladie zeleno-modré vajcia, najčastejšie dve, maximálne tri.

Typickým znakom člnozobcov je ich robustný zobák, ktorý pripomína čln, podľa čoho dostal aj svoje slovenské pomenovanie. Ďalším typickým znakom je chochol, ktorý má na hlave (Gloser, 1994). Počas letu má esovité zvlhnený krk. Tieto jedince dorastajú do veľkosti 120 - 150 cm. Hlavnou zložkou jeho potravy sú ryby, väčšie bezstavovce a žaby (Volf *et* Filex, 1997).

3.1.5 Čel'ad' bocianovité

Čel'ad' bocianovité zastrešuje vtákov s pomerne veľkým telom. Dlhé nohy sú z časti neoperené a palec nie je dostatočne vyvinutý (Hudec *et* Šťastný, 1994). Medzi prstami sa nachádza kožovitý záhyb, plávacia blana. Chýbajú im niektoré z typických znakov brodivých ako napríklad malé prachové perá alebo drobné pílkovité zúbky na stredom prste (Hanzák, 1974). Krk je pri lete natiahnutý v smere letu bez ohybu. Vtáci z čel'ade bocianovité patria, vďaka širokým krídlam, medzi skvelých letcov. Vo vzduchu dokážu plachtiť, prípadne stúpať do vyšších výšok bez pohybu krídel (Hanzák, 1974). Na ich sfarbení sa podieľajú prevažne farby biela, šedá a čierna. Chvost je krátky a oválny (Gosler, 1994). Až na veľkosť tela, kedy je samec väčší než samica, u nich nie je viditeľný pohlavný dimorfizmus (Šťastný *et al.*, 1998). Ich v dospelosti nevyvinuté hlasové ústrojenstvo a hlasové svalstvo im neumožňuje vytvárať hlasové prejavy. Jedným z komunikačných možností je teda klopanie zobákom. Tvar zobáku sa mení v závislosti od druhu. Je prispôsobený typu potravy, ktorou sa daný druh živí (del Hoyo *et al.*, 1992).

Aj keď u niektorých druhov nie je ustálené ich taxonomické zaradenie, je dnes uznaných a zaužívaných 19 druhov z čel'adi bocianovité (del Hoyo *et al.*, 1992).

Prevažná väčšina kozmopolitne rozšírených druhov sa vyskytuje na území Afriky. Na území Českej a Slovenskej republiky sa vyskytujú bocian čierny (*Ciconia nigra*) a bocian biely (*Ciconia ciconia*) (Hudec *et* Šťastný, 1994).

Podľa niektorých autorov je čeľaď bocianovité rozdelená do troch tribusov. Konkrétne sú to Leptoptilini, Ciconiini a Mycterini (del Hoyo *et al.*, 1992).

Leptoptilini sa ďalej rozdeľujú na rody *Leptoptilos*, *Jabiru* a *Ephippiorhynchus*. Vyznačujú sa pomerne veľkým telom. Zobák môže mať rôznu morfológiu či už dlhý a na konci zašpicatený čím je uspôsobený na lov v plytkých vodách alebo môže mať kužeľovitý tvar a veľké rozmery. Povrch hlavy sa vyznačuje sporadickým operením, prípadne nie je operená vôbec a tieto nahé miesta ďalej pokračujú aj na krk (del Hoyo *et al.*, 1992).

Do tribusu Ciconiini patrí len jeden rod *Ciconia*, do ktorého spadá 7 druhov. Patria sem vtáci so stredne veľkým telom. Zobák nie je obzvlášť veľký, svojim tvarom je prispôsobený k vyhľadávaniu a lovu potravy (del Hoyo *et al.*, 1992).

Tribus Mycterini je rozdelený na rody *Anastomus* a *Mycteria*. Zobák sa zužuje smerom ku špičke. Je dlhý, mierne zahnutý a na priereze guľatý.

U rodu *Anastomus* má vrchnú časť rovnú, spodná je užšia a zakrivená, čo vytvára medzeru medzi časťami zobáku. Smerom ku koncu zobáku sa medzera zmenšuje. Tento zvláštny typ zobáku slúži ako prispôsobenie k typu a spôsobu vyhľadávania potravy. Na hlave, prípadne na krku, sa u niektorých druhov nevyskytuje perie. V období párenia sa zafarbuje nahá pokožka hlavy do výraznejších a sýtejších farieb (del Hoyo *et al.*, 1992).

Pre rod *Mycteria* sú charakteristickí vtáci väčšieho veku s neopereným povrchom hlavy. Ich typické sfarbenie je biele s občasným sfarbením koncových častí tela do čiernej alebo do ružovej (Brown *et al.*, 1993). Do tohto rodu patria štyri druhy a to myktéria africká (*Mycteria ibis*), myktéria americká (*Mycteria americana*), myktéria biela (*Mycteria cinerea*) a myktéria lysohlavá (*Mycteria leucocephala*).

Myktéria africká (*Mycteria ibis*) sa vyskytuje prevažne v Afrike, v Egypte, Tunisku prípadne na Madagaskare. Pri južnom pobreží Spojených štátov amerických sa vyskytuje myktéria americká (*Mycteria americana*). A ďalším druhom je myktéria biela

(*Mycteria cinerea*), ktorej stanovisko je prevažne v Malajzii, Indonézii a Kambodži (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.1.5.1 Myktéria lysohlavá (*Mycteria leucocephala*)

Zaradenie myktérie lysohlavej do taxonomických jednotiek:

| | |
|-------------------|---|
| Ríša: | Živočíchy (Animalia) |
| Kmeň: | Chordáty (Chordata) |
| Podkmeň: | Stavovce (Vertebrata) |
| Trieda: | Vtáky (Aves) |
| Podtrieda: | Letce (Neognathae) |
| Rad: | Brodivce (Ciconiiformes) |
| Čeľaď: | Bocianovité (Ciconiidae) |
| Tribus: | Mycterini |
| Rod: | Myktéria (<i>Mycteria</i>) |
| Druh: | Myktéria lysohlavá (<i>Mycteria leucocephala</i>) |

Myktéria lysohlavá patrí k veľkým brodivým vtákom. Vyskytujú sa v južnej a juhovýchodnej Ázii, po celom Indickom subkontinente, v blízkosti vodných plôch. Žijú v menších kolóniách spolu s inými druhmi. Vzhľadom k strate prirodzených biotopov a znečisťovaniu prostredia sa významne znižuje počet týchto jedincov (Yee *et al.*, 2013). V súčasnosti je tento druh klasifikovaný ako takmer ohrozený. Odhaduje sa 15 000 jedincov v južnej Ázii a približne 10 000 jedincov v juhovýchodnej Ázii. Aj keď je považovaný za najpočetnejší druh z rodu Myktéria, je to skôr odrazom vzácnosti a ohrozenia väčšiny druhov ako by to malo vypovedať o bezpečnosti tohto druhu.

Obrázok č.1: Myktéria lysohlavá, Foto: Jan Ševčík.



Dorastá do veľkosti 93 až 102 cm s hmotnosťou približne 2 až 3,5 kg. Rozpätie jeho krídel je 150 až 160 cm. Krk majú pri lete vystretý rovno pred sebou. Dlhý, mierne zahnutý zobák so žltým sfarbením je typický pre tento druh. Perie je prevažne biele, vyskytuje sa občasná ružová a čierna mozaika na krídlach, celkové sfarbenie dopĺňa ešte do červena sfarbené nohy a hlava bez operenia (del Hoyo *et al.*, 1992).

Medzi typickú potravu myktérie lysohlavej patria ryby, ktoré loví špecifickým spôsobom. Pootvorený zobák ma ponorený vo vode a pohybom hlavy z jednej strany na druhú vyhľadáva potravu. Jej potravou môžu byť taktiež aj žaby alebo hady (Anonymous, 2014).

Pohlavnej dospelosti dosahujú v období dvoch až troch rokov. Samička kladie 2 - 5 vajec do hniezd, ktoré sa nachádzajú v korunách stromov. Starostlivosť o vajíčka je rovnomerne rozložená na oboch rodičov. Mláďatá sa liahnu po 27 alebo 30 dňoch a následne v hniezde zotrvávajú ďalšie dva mesiace (Anonymous, 2014).

3.2 Repetitívna DNA

DNA eukaryotických organizmov obsahuje veľký podiel nekódujúcich sekvencií (Snustad *et* Simmons, 2009). Okrem minoritnej časti intronov a regulačných oblastí obsahuje aj majoritnú časť repetitívnej DNA (Campbell *et* Reece, 2006). Repetitívna DNA sa skladá z nukleotidových sekvencií s vysokým množstvom kópií. Ak sa kópie sekvenčného motívu nachádzajú v blokoch a v rade za sebou, jedná sa o tandemové repetície. Pokiaľ sú repetitívne sekvencie rozptýlene v genóme ako jednotlivé kópie ide o rozptýlené repetície (Bennet, 2000)

Rozptýlená repetícia je výsledkom procesu transpozície, čo je rozmiestnenie segmentov DNA na rôzne miesta v genóme. Ide o hlavnú zložku zmien obsahu DNA u vyšších eukaryotických organizmov (Zhao *et al.*, 1998). U tohto typu repetície prevažujú pohyblivé genetické elementy, transpozóny (Campbell *et* Reece, 2006).

Na rozdiel od rozptýlenej sa tandemová repetícia vyznačuje za sebou idúcimi identickými alebo takmer identickými jednotkami s dĺžkou až niekoľko nukleotidov. Počas replikácie dochádza k častejšiemu rozširovaniu a tým sa zväčšuje počet opakovaní (Itsko *et al.*, 2011). Väčšina tandemových repetícií sa nachádza v blízkosti chromozomovej teloméry a centroméry, kde majú dôležitú úlohu v udržiavaní genomickej integrity (Blackburn, 1991) a segregácie (Catasti *et al.*, 1994).

Na základne počtu opakujúcich sa kópií v tandemovo repetitívnej DNA ich môžeme rozdeliť do troch kategórií: mikrosatelitová DNA (10 - 100 kópií), minisatelitná DNA (100 - 100 000 kópií), satelitná DNA (100 - 1 000 000 kópií). Toto rozdelenie sa dá taktiež aplikovať na základe dĺžky základného motívu. U mikrosatelitov sa vyskytuje 1 - 6 párov báz, u minisatelitov 6 - 100 párov báz a u satelitov 100 - 300 párov báz (Vergnaud *et* Denoeud, 2000; Lai, 2003).

3.2.1 Satelity

Jedná sa o najväčšie tandemové repetície, ktoré sú zložené z relatívne dlhých jednotiek. Satelitná DNA sa hojne vyskytuje v oblastiach centromér a konštitutívneho heterochromatínu. Získava sa centrifugáciou v hustotnom gradiente, kedy sa oddeľuje

menšinový podiel alebo tiež satelitný prúžok DNA podľa čoho dostala aj svoj názov (Bennet, 2000).

Medzi hlavné triedy patrí α – satelitná DNA, kde dĺžka opakovania dosahuje 171 bp a nachádza sa v centromerickej oblasti všetkých chromozómov. Jej funkciou je výstavba kinetochóru počas bunecného delenia. Ďalšími triedami sú β – satelitná DNA s dĺžkou opakovania 68 bp, satelitná DNA 1 s dĺžkou opakovania 25 - 48 bp a satelitná DNA 2, 3 s dĺžkou opakovania 5 bp. Funkcia týchto satelitov nie je doposiaľ známa, obvykle sú považované za odpadnú DNA (Ugarkovič *et* Plohl, 2002).

3.2.2 Minisatelity

Objav minisatelitov je spojený s dôležitými vlastnosťami ľudského genómu ako je génová regulácia a imprinting. Avšak obdobné štruktúry DNA boli pozorované aj u ďalších organizmov, vrátane baktérií. Minisatelity patria medzi kratšie tandemové repetície o dĺžke niekoľko kilobáz s veľkosťou základného motívu 6 – 100 bp (Bennett, 2000; Vergnaud *et* Denoeud, 2000).

Na základe schopnosti mutácie približne v rozsahu 0,4 až 5 % za generáciu sa minisatelity vyznačujú polymorfizmom. Vysoký polymorfizmus v množstve repetícií v rámci jedného lokusu úzko súvisí s vysokou premenlivosťou (Flegr, 2009).

Minisatelity môžu byť rozdelené do dvoch tried. Jednou z nich je telomerická minisatelitná DNA, ktorá sa skladá z 10 - 15 kbb. Jednotky repetície sú tvorené hexanukleotidovými sekvenciami, ktoré sú prevažne tvorené nukleotidmi TTAGGG. Telomerická minisatelitná DNA má chrániť chromozomálne konce pred degradáciou DNA polymerázy v priebehu replikácie DNA. Druhou triedou je hypervariabilná minisatelitná DNA taktiež uvádzaná ako VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats). Bola objavená v roku 1985 Alecom Jeffreysom a jeho kolegami. Základná jednotka repetície sa môže líšiť v dĺžke od 6 do 50 nukleotidov. Na jej základe môže byť určená identifikácia jedincov a ich príbuzenských vzťahov (Bennet, 2000).

3.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity alebo tiež SSRs (Simple Sequence Repeats) prípadne STRs (Short Tandem Repeats) sú najčastejšie využívané druhy markerov v genetických štúdiách s aplikáciou v rôznych oblastiach genetiky ako napríklad v populačnej genetike, šľachtení, genetickom mapovaní alebo testovaní otcovstva (Oliveira *et al.*, 2006).

V eukaryotických a prokaryotických organizmoch môžeme mikrosatelity objaviť v kódujúcich alebo nekódujúcich oblastiach (Zima, 2004). Jedná sa o krátke tandemové repetície, kde sa opakovania pohybujú približne od 1 až 6 párov báz (Lai, 2003). Charakteristickou vlastnosťou mikrosatelitov je vysoký stupeň polymorfizmu. Ich hlavnou funkciou je spoluúčasť na transkripcii, translácii, regulácii rekombinácie DNA a organizácii chromatinu (Christiakov *et al.*, 2006). V mikrosatelitnej DNA sú v najväčšej miere zastúpené dinukeotidové opakovania CA/TG. Mono-, tri- a tetranukleotidové opakovania sú zriedkavejšie, ale s väčšou mierou polymorfizmu (Ellegren, 2004).

Podľa Oliveira *et al.* (2006) boli mikrosatelity rozdelené do 4 skupín podľa štruktúry opakujúcej sa sekvencie. Prvou skupinou sú dokonalé mikrosatelity, kde nedochádza k prerušeniu bázou, ktorá nespadá do danej repetície. Priebeh opakovania báz je tak plynulý ako napríklad TATATATATATA. V prípade nedokonalých mikrosatelitov dochádza ku vloženiu bázy, ktorá do reťazca repetície nepatrí. V tomto prípade by repetícia mohla vyzerat' nasledujúco TATATACTATATA. Ak by sa medzi jednotkami repetície vyskytlo viac báz, ktoré do reťazca nespádajú, hovoríme o prerušených mikrosatelitoch. Ako príklad môže byť vloženie páru báz CG do reťazca TATATATATATA, takže výsledné usporiadanie bude TATATACGTATATA. Ak by sa objavil reťazec TATATAGTGTGT, kedy sa za sebou striedajú dve jednotky repetície, hovoríme o mikrosatelitoch zložených (Oliveira *et al.*, 2006).

Medzi krátke sekvencie DNA patria aj EST klony (Expressed Sequence Tags). Podobne ako mikrosatelity obsahujú repetitívne sekvencie a aj ich dĺžková variabilita sa testuje PCR amplifikáciou. Avšak mikrosatelity sú získavané a odvodené z genómu viac či menej náhodne, na rozdiel od EST klonov, ktoré sa získavajú z genomických knižníc (Shikano *et al.*, 2010). Sú odvodené od cDNA a ich veľkosť sa pohybuje približne od 300 do 1 000 bp. EST predstavujú gény exprimované v tkanivách. Slúžia ako zdroj

informácií o génoch exprimovaných v špecifických tkanivách, alebo v závislosti na odpovedi voči vonkajším vplyvom. EST sekvencie môžu slúžiť na porovnanie medzi rôznymi organizmami alebo pre rozlišovanie génových rodín a identifikáciu alelických variácií. Aj keď sú EST považované za skvelý zdroj sekvenčných dát, tieto údaje nie sú vysoko kvalitné. Vzhľadom na to, že EST sekvencie sú generované v jednom mieste majú vyššiu chybovosť. Tieto zmeny sú spôsobené častými substitúciami, deléciami alebo inzerciami (Wolsberg *et* Landsman, 2001).

3.2.3.1 Mutácie mikrosatelitov

Mutačné mechanizmy mikrosatelitnej DNA nie sú doposiaľ dostatočne objasnené, no aj napriek tomu patria mikrosatelity k vysoko používaným v rôznych oblastiach genetiky. Ako ďalej uvádzajú autori Oliveira *et al.* (2006) mutačná rýchlosť mikrosatelitov prevyšuje rýchlosť na kódujúcich oblastiach genómu. Táto rýchlosť počas jednej generácie je vymedzená cca od 10^{-2} až 10^{-6} nukleotidov na jeden lokus. Medzi alternatívy, ktoré boli navrhnuté ako možné vysvetlenie pre tak vysokú mutačnú rýchlosť patrí nerovnomerný *crossing-over*, možné chyby počas rekombinácie, prekláznutie polymerázy počas replikácie alebo reparácie DNA (Oliveira *et al.*, 2006).

3.2.3.2 Použitie mikrosatelitov

Mikrosatelity sú veľmi polymorfné vďaka ich vysokej mutačnej rýchlosti (Litt *et* Luty, 1989; Weber *et* May, 1989). Takže v jednej populácii sa môže nachádzať viacero variant, ktoré sa od seba líšia počtom repetitívnych jednotiek a teda celkovou dĺžkou. Táto variabilita je jednoducho testovateľná v laboratóriu a je tak možné sledovať genetickú rozmanitosť medzi jednotlivými druhmi, v rámci jedného druhu alebo v rámci jedincov vo vnútri jednej populácie.

Využitie mikrosatelitov v genetických štúdiách je veľmi široké. Ako kodominantné markery s relatívne malou veľkosťou môžu byť jednoducho amplifikované v priebehu PCR. Ich uplatnenie je v prvom rade pri štúdiu príbuzenských vzťahov a určovaní paternity. Svoje uplatnenie môžu nájsť taktiež pri štúdiu parametrov populačnej genetickej štruktúry, ako je tok génov a jeho bariéry, efektívna veľkosť populácie alebo odchylky od Hardy - Wienbergovej rovnováhy (Flegr, 2009).

Hoci sú mikrosatelity široko používané ako molekulové markery, vyhodnocovanie získaných údajov z elektroforetickej separácie produktov PCR môže skresľovať prítomnosť *stutter* bandov, nulových alel alebo alelová homoplázia.

Stutter bandy alebo tiež tieňové bandy sa tvoria počas PCR amplifikácie kedy dochádza ku sklzu DNA polymerázy (Daniels *et al.*, 1998). Pri mikrosatelitoch s výskytom dinukleotidových reptícií je väčšia pravdepodobnosť výskytu vzniku tieňových bandov. Ich produkt je vo väčšine prípadoch kratší ako produkt hlavný, len zriedka kedy je to naopak. Hlavný problém pri tvorbe *stutter* bandov spočíva v prekrytí alely hlavného produktu s alelou tieňových bandov, čo znemožňuje následne hodnotenie (Walsh *et al.*, 1996).

Nulové alely, taktiež známe ako neamplifikujúce sa alely, patria k javom, ktoré môžu negatívne ovplyvniť hodnotenia mikrosatelitovej DNA. Metódou PCR sa nedajú amplifikovať a taktiež ich nie je možné vizualizovať (Dakin *et al.*, 2004). Ich vznik je podmienený neuskutočnením PCR reakcie. Tento jav je zapríčinený mutáciou v mieste DNA, ktoré je homologické k sekvencii primerov. Nulové alely sa dajú odstrániť nasekvenovaním PCR produktu, testovaného lokusu a následným posunom sekvencie o niekoľko nukleotidov, do miest kde sa mutácia nenachádza. Takto upravené páry primerov je možné použiť pre ďalšiu identifikáciu paternity (Dakin *et al.*, 2004). Ďalšou alternatívou ako môžu vznikať neamplifikujúce sa alely je možnosť posunu polymerázy počas PCR reakcie alebo ak najskôr dôjde k amplifikácii kratších alel (Chapuis *et al.*, 2007).

Analýzy populačno-genetických štúdií môžu byť ovplyvnené aj alelovou homopláziou. V tomto prípade sa alely javia ako totožné aj keď nemajú rovnakého predka. Tento jav je zapríčinený mutáciou (Estoup, 2002). Je teda potrebné otestovať väčšie množstvo lokusov aby mohla byť vylúčená chyba spôsobená mutáciou (Goodman, 1998).

3.2.3.3 Hľadanie nových mikrosatelitových markerov

Sú známe dve alternatívy izolácie mikrosatelitov. Prvá možnosť je vyhľadávanie *de novo* skenovaním genómových knižníc. Druhou možnosťou je *cross-species* PCR amplifikácia, kedy sa jedná o použitie mikrosatelitov už vyizolovaných blízko

príbuzných druhov, kde však so vzdialenejšou fylogenetickou príbuznosťou klesá aj úspešnosť tejto metódy (Scribner *et* Pearce, 2000)

Genómová knižnica sa skladá z množstva vektorov. Vo vektoroch sú zabudované náhodne časti DNA, ktoré boli získané z genómu študovaného jedinca. Tieto skupiny vektorov sú uchovávané za stabilných podmienok a podľa ich sekvencie alebo proteínu je v prípade potreby možné dohľadať určitý fragment DNA (Zane, 2002).

Pri samotnej izolácii primerov je DNA rozdelená pomocou restriktívneho enzýmu. Menej častá je metóda rozkladania ultrazvukom. Vhodný restriktívny enzým je zvolený na základe dĺžky úseku DNA, hľadacom mikrosatelite alebo na základe typu ukončenia restriktívneho fragmentu. Jednotlivé restriktívne fragmenty sú zaligované do vektoru a vložené do baktérií. Takto získané klony sa postupne skenujú a zisťuje sa prítomnosť mikrosatelitov. Vyhľadávanie týchto klonov sa realizuje blottingom a hybridizáciou s rádioaktívne alebo nerádioaktívne označenou sondou, v ktorej je uložená repetitívna sekvencia. Následne sú kapilárnou elektroforézou analyzované dĺžky alel, ak je potvrdený polymorfizmus je možné mikrosatelity spracovávať pre ďalšie účely (Zane, 2002).

Nevýhoda metódy *de novo* spočíva v zdĺhavom postupe práce a vysokých materiálových nákladoch. Naopak metóda *cross-species* PCR amplifikácia ponúka rovno dve výhody. Jednou z nich je nižšia časová náročnosť z pracovného hľadiska a druhou je nízka finančná náročnosť (Galbusera *et al.*, 2000).

3.2.3.4 Mikrosatelity z radu tučniaky

Tučniak žltohlavý (*Eudiptes chrysolophus*)

Ahmed *et al.* (2009) vyizolovali genomickú DNA z krvi tučniaka žltohlavého. Z daných vzoriek bolo získaných 132 mikrosatelitových sekvencií z nich 47 obsahovalo najmenej osem jednotiek repetícií. Vo výsledku bolo navrhnutých 32 párov primerov pre testovanie na celkom 28 jedincoch tučniaka žltohlavého. Po počiatočnom testovaní PCR metódou bolo vyradených 7 párov primerov z dôvodu nespoľahlivosti alebo neúspešnej PCR.

Výsledných 25 mikrosatelitov bolo ďalej testovaných na 4 druhov tučniakov. Konkrétne na tučniakoch: tučniak okatý (*Pygoscelis adeliae*), tučniak čiapočkatý (*Pygoscelis antarctica*), tučniak bielotemenný (*Pygoscelis papua*) a tučniak patagónsky (*Aptenodytes patagonicus*). Osem až dvanásť lokusov bolo polymorfných v závislosti na druhu. Tieto lokusy boli navrhnuté pre ďalšie štúdia populačnej genetiky u radu tučniakov (Ahmed *et al.*, 2009).

Tučniak najmenší (*Eudyptula minor*)

Z niekoľko málo tučniakov najmenších Billing *et al.* (2007) extrahovali genomickú DNA, ktorá bola obohatená o GA a GAAA repeticie. Zo 192 skúmaných kolónií so sekvenciou GA bolo z 18 pozitívnych klonov získaných 9 klonov, ktoré obsahovali 7 a viac jednotiek repeticíí. Zo 179 kolónií so sekvenciou GAAA bolo 10 klonov pozitívnych, z ktorých bol získaný len jeden vhodný klon. Pre tieto klony boli navrhnuté páry primerov pre ďalšie testovanie.

Páry primerov, ktoré poskytli špecifický produkt, boli ďalej skúmané na polymorfizmus. Testovanie prebehlo na 20 nepríbuzných jedincoch z Phillip Island a medzi 5 a 15 jedincami z populácie na Troubridge Island. Sedem lokusov bolo polymorfných u tučniaka najmenšieho, aj keď dva z nich vykazovali nízku variabilitu. Jeden z lokusov bol monomorfný pri testovaní populácie z Phillip Island, ale polymorfný pri testovaní na populácií z Troubridge Island, čo má možné využitie v populačnej genetike (Billing *et al.*, 2007).

Tučniak žltoký (*Megadyptes antipodes*)

Boessenkool *et al.* (2008) sa vo svojej práci zaoberali hľadaním mikrosatelitov u tučniaka žltokého. Dve obohatené genómové knižnice tučniaka žltokého boli zostavené s použitím modifikovanej verzie metódy, ktorú popísali Perrin *et Roy* (2000). V týchto dvoch knižniciach bola zistená nízka frekvencia pozitívnych klonov a tak na základe metódy opísanej Glenn *et Schable* (2005) bola vytvorená tretia genomická knižnica.

38 párov primerov bolo navrhnutých z prvých dvoch genomických knižníc a ďalších 20 z tretej genomickej knižnice. Amplifikácia bola testovaná na 43 jedincoch tučniaka žltokého. Dvanásť lokusov bolo uznaných ako polymorfných, s počtom alel

od 2 do 8. Tieto lokusy budú vhodné pre štúdia genetickej variability tučniaka žltookého (Boessenkool *et al.*, 2008).

Tučniak okatý (*Pygoscelis adeliae*)

Mikrosatelity tučniaka okatého boli vyizolované z krvi odobranej z 13 hniezdiacich kolónií vo východnej Antarktíde a zo 7 kolónií pozdĺž pobrežia Victoria Land (Roeder *et al.*, 2001).

Sedem mikrosatelitov bolo študovaných na 442 jedincoch tučniaka okatého. Počet alel na lokus sa pohyboval v rozmedzí 4 - 20. Celkovo bolo identifikovaných 69 alel. S výnimkou jedného lokusu, nebola zistená žiadna významná genetická alebo genotypová heterogenita na ďalších populáciách (Roeder *et al.*, 2001).

Tučniak okuliarnatý (*Spheniscus demersus*)

Z krvi 25 jedincov tučniaka okuliarnatého chovaného v zajatí bola vyizolovaná genomická DNA. Táto DNA bola obohatená o sekvencie obsahujúce repetície. Z daných vzoriek bolo získaných 12 lokusov, z ktorých bolo 8 polymorfných. Počet alel sa pohyboval v rozmedzí 2 - 6, a s pozorovanou heterozygotnosťou 0,381 - 0,84. Tieto lokusy sú prvé špecifické markery tučniaka okuliarnatého, vhodné na štúdia populačno-genetickej štruktúry, toku génov a hladiny variability u tohto druhu (Labuschagne *et al.*, 2013).

Tučniak Humboldtov (*Spheniscus humboldti*)

Schlosser *et al.* (2003) metódou *cross-species* PCR amplifikácie testovali 7 mikrosatelitov navrhnutých pre tučniaka Humboldtovho na 8 druhov tučniakov. A to konkrétne tučniak dvoj pásy (*Spheniscus magellanicus*), tučniak okuliarnatý (*Spheniscus demersus*), tučniak hrubozobý (*Eudyptes chrysocome*), tučniak najmenší (*Eudyptula minor*) a tučniak okatý (*Pygoscelis papua*), u ktorých boli všetky skúmané mikrosatelity polymorfné. U tučniaka žltohlavého (*Eudyptes chrysolophus*) a tučniaka kráľovského (*Aptenodyptes patagonicus*), bolo zistených 5 polymorfných mikrosatelitov. A u tučniaka čiapočkatého (*Pygoscelis antarctica*) bol objavený 1 polymorfný mikrosatelit. Počet alel sa pohyboval medzi 5 a 11.

Schlosser *et al.* (2008) v ďalšom z ich výskumov pokračoval v skúmaní mikrosatelitov tučniaka Humboldtovho. Kde sa jednalo o testovanie 12 mikrosatelitov

na 336 jedincov rovnakého druhu. Výsledky ukázali, že dochádzalo k dlhodobému toku génov medzi populáciami.

Tučniak galapážsky (*Spheniscus mendiculus*)

Autori Akst *et al.* (2002) sa vo svojom článku zaoberali porovnaním genetickej diverzity medzi tučniakom galapážskym a tučniakom magellanskym. 6 mikrosatelitov bolo získaných zo 4 druhov tučniakov (tučniak galapážsky, tučniak Humboldtov, tučniak okuliarnatý, tučniak magellansky), optimalizovaných pre tieto štúdiá a použitých metódou *cross-species* PCR amplifikácie. 5 lokusov vykazovalo polymorfizmus pri štúdiu na 46 jedincoch z oboch druhov. Počet alel u tučniaka galapážskeho sa pohyboval v rozmedzí 2 - 3 a u tučniaka magellanskeho 6 - 19. Nízka úroveň heterozygotnosti u tučniaka galapážskeho je v úzkej súvislosti s jeho nízkou efektívnou veľkosťou populácie.

3.2.3.5 Konzervované vtáče mikrosatelity

Dawson *et al.* (2013) sa vo svojej štúdií venovali vysoko konzervovaným sekvenciám s vysokým počtom opakujúcich sa repetícií od zebričky pestrej (*Taeniopygia guttata*) a kury domácej (*Gallus gallus*). 24 párov primerov bolo navrhnutých z homologických sekvencií, ktoré mali aspoň osem opakujúcich sa repetícií u oboch druhov. Navrhnuté mikrosatelity boli testované na zebričke pestrej a výsledné polymorfne produkty mali 2 - 11 alel.

Táto sada konzervovaných vtáčích mikrosatelitov nemá za úlohu len znižovať náklady na širokú škálu genetických štúdií, ale poskytuje aj možnosť porovnania genetickej rozmanitosti medzi rôznymi druhmi (Dawson *et al.*, 2013).

3.2.3.6 EST sekvencie

Dawson *et al.* (2010) porovnali dva veľmi vzdialené druhy vtákov, zebričku pestrú (*Taeniopygia guttata*) a kuru domácu (*Gallus gallus*), a vyhľadali ich homologické sekvencie. Z týchto druhov získali 35 vtáčích EST mikrosatelitov a podrobili ich testovaniu na 52 druhov vtákov. Počet alel u jednotlivých polymorfnych produktov sa pohyboval v rozmedzí 5 - 17.

Autori uvádzajú vhodnosť širokého použitia týchto lokusov ako napríklad štúdium paternity alebo populačné štúdia. Môžu uľahčovať porovnanie genómov, mapovanie genómov alebo štúdium rekombinácie (Dawson *et al.*, 2010).

3.2.3.7 Mikrosatelity z radu brodivce

Volavka žltozobá (*Egretta eulophotes*)

Dai *et al.* (2013) odobrali genomickú DNA z jedného jedinca volavky žltozobej. 74 sekvencií splňovalo podmienku dostatočnej dĺžky repetícií. Pre tieto sekvencie navrhli špecifické páry primerov, ktoré boli testované PCR metódou na volavke žltozobej. U testovaných 32 jedincoch bolo pozorovaných 23 polymorfných lokusov. Počet alel na jeden lokus sa pohyboval v rozmedzí 2 - 9.

3.2.3.8 Mikrosatelity z radu potápky

Potápka západná (*Aechmophorus occidentalis*)

Pri vyhľadávaní mikrosatelitov potápky západnej bolo osekvenovaných 69 sekvencií. Pre ďalšie skúmanie bolo navrhnutých 25 na základe dĺžky repetície. Ako polymorfné bolo vyhodnotených 11 mikrosatelitov, ktorých počet alel sa pohyboval v rozmedzí 2 - 8. Okrem potápky západnej boli dané mikrosatelity testované aj na potápkke Clarkovej, kde sa zhodovali polymorfné mikrosatelity. Ich rozmedze alel na jeden lokus bolo 2 - 10 (Humple, 2009).

4 Materiál a metódy

4.1 Biologický materiál

Biologický materiál pre túto bakalársku prácu poskytla ZOO Zlín-Lešná, kde jej pracovníci odobrali krv šiestich jedincov myktérie lysohlavej (*Mycteria leucocephala*) a uschovali do lyzačného pufru.

Samotný proces izolácie genomickej DNA bol vykonaný vedúcim bakalárskej práce fenol-chloroformovou metódou. Pracovný postup podľa predlohy z publikácie Maniatis *et. al* (1982) bol pozmenený pre materiálové a technické vybavenie Laboratória populačnej genetiky na Katedre bunecnej biológie a genetiky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

4.2 PCR amplifikácia mikrosatelitových lokusov

169 párov primerov bolo testovaných s využitím PCR amplifikácie na 6 jedincoch myktérie lysohlavej (*Mycteria leucocephala*). Primery boli navrhnuté pre amplifikáciu mikrosatelitových lokusov u 7 druhov z radu tučniakov, po jednom druhu z radu potápka a brodivce. Ďalšie testované skupiny boli EST mikrosatelity a konzervované vtáče mikrosatelity.

Tabuľka č. 1: Prehľad použitých mikrosatelitov pri testovaní myktérie lysohlavej. V tabuľke je zobrazený rád, zdrojový druh, názov lokusu, autor a rok publikácie.

| Rád | Zdrojový druh | Mikrosatelity | Literárny zdroj |
|------------------------------------|--|--|---|
| Tučniaky (Sphenisci- formes) | Tučniak žltohlavý (<i>Eudypetes chrysolophus</i>) | Ech003, Ech005, Ech007, Ech008, Ech009, Ech010, Ech011, Ech012, Ech014, Ech020, Ech024, Ech029, Ech030, Ech036, Ech039, Ech050, Ech051, Ech060, Ech063, Ech065, Ech071, Ech081, Ech091, Ech113, Ech130 | Ahmed <i>et</i> <i>al.</i> , 2009 |

Tabuľka č. 1: Pokračovanie 1

| Rad | Zdrojový druh | Mikrosatelity | Literárny zdroj |
|------------------------------------|--|---|--|
| Tučniaky (Sphenisci- formes) | Tučniak najmenší (<i>Eudyptula minor</i>) | Emm1, Emm2, Emm3, Emm4, Emm5, Emm6, Emm7, Emm8, | Billing <i>et al.</i> , 2007 |
| | Tučniak žltooký (<i>Megadyptes antipodes</i>) | Man03, Man08, Man13, Man21, Man22, Man27, Man39, Man47, Man50, Man51, Man54, Man55 | Boessenkool <i>et al.</i> , 2008 |
| | Tučniak okatý (<i>Pygoscelis adeliae</i>) | AM3, AM12, AM13, TP500, RM3, RM6 | Roeder <i>et al.</i> , 2001 |
| | Tučniak okuliarnatý (<i>Spheniscus demersus</i>) | PNN01, PNN03, PNN05, PNN06, PNN07, PNN08, PNN09, PNN12 | Labuschagne <i>et al.</i> , 2013 |
| | Tučniak Humboldtov (<i>Spheniscus humboldti</i>) | Sh1Ca09, Sh1Ca12, Sh1Ca16, Sh1Ca17, Sh2Ca12, Sh2Ca21, Sh2Ca22, Sh2Ca31, Sh2Ca40, Sh2Ca49, Sh2Ca55, Sh2Ca58 | Schlosser <i>et al.</i> , 2003 |
| | Tučniak galapážsky (<i>Spheniscus mendiculus</i>) | B3-2, G3-11, G3-6, G2-2, H2- 6, M1-11 | Akst <i>et al.</i> , 2002 |
| | EST mikrosatelity | TG01-000, TG01-040, TG01-077, TG01-092, TG01-114, TG01-124, TG01-147, TG01-148, TG02-078, TG02-088, TG02-120, TG03-002, TG03-031, TG03-034, TG03-035, TG03-098, TG04-004, TG04-012, TG04-012A, TG04-041, TG04-061, TG05-030, TG05-046, TG05-053, TG06-009, TG07-022, TG08-024(1), TG08-024(2), TG11-011, TG12-015, TG13-009, TG13-016, TG13-017, TG22-001 | Dawson <i>et al.</i> , 2010 |

Tabuľka č. 1: Pokračovanie 2

| Rad | Zdrojový druh | Mikrosatelity | Literárny zdroj |
|----------------------------|--|--|-----------------------------|
| | konzervované vtáče mikrosatelity | CAM-01, CAM-02, CAM-03, CAM-04, CAM-05, CAM-06, CAM-07, CAM-08, CAM-09, CAM-10, CAM-11, CAM-12, CAM-13, CAM-14, CAM-15, CAM-16, CAM-17, CAM-18, CAM-19, CAM-20, CAM-21, CAM-22, CAM-23, CAM-24 | Dawson <i>et al.</i> , 2013 |
| Brodivce (Ciconiiformes) | Volavka žltózobá (<i>Egretta eulophotes</i>) | Ee04, Ee06, Ee10, Ee17, Ee18, Ee20, Ee22, Ee23, Ee24, Ee26, Ee28, Ee30, Ee33, Ee34, Ee37, Ee41, Ee42, Ee43, Ee44, Ee45, Ee46, Ee50, Ee51 | Dai <i>et al.</i> , 2013 |
| Potápky (Podicipediformes) | Potápka západná (<i>Aechmophorus occidentalis</i>) | B8, B11, B102, B112b, B113, C5, E202, G118, G206, G209, G215 | Humple, 2009 |

Samotná PCR bola vykonaná podľa tabuľky č. 2, kde sú uvedené presné objemy jednotlivých zložiek. Celkový objem bol vypočítaný s ohľadom na počet skúmaných jedincov.

Tabuľka č. 2: Presné objemy jednotlivých zložiek PCR zmesi.

| Zložky PCR zmesi | Objem [μl] |
|--------------------------------------|------------|
| Deionizovaná voda | 44,4 |
| Reaction buffer 10× | 6,7 |
| Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l) | 4,0 |
| Roztok dNTPs (20 μmol/l) | 0,7 |
| Primer R (10 μmol/l) | 3,3 |
| Primer F (10 μmol/l) | 3,3 |
| <i>aTaq</i> DNA polymeráza 5 U/μl | 1,0 |

Všetky PCR chemikálie boli zvortexované a scentrifugované. Jednotlivé zložky PCR boli pipetované do 1,5 ml skúmaviek, ktoré boli vyautoklávované a riadne označené. Výsledná PCR zmes bola opäť zvortexovaná a scentrifugovaná.

Do pripravených a označených mikroskúmaviek určených na PCR bola napipetovaná vyizolovaná genomická DNA o objeme 1 μ l. K tomuto roztoku bola pripipetovaná PCR reakčná zmes s objemom 9 μ l. Takto pripravené mikroskúmavky boli uzavreté a vložené do termocyklieru, kde dochádza k polymerázovej reťazovej reakcii v jednotlivých cykloch vid' tabuľka č. 3.

Tabuľka č. 3: Cykly prebiehajúce v termocyklieru.

| Čas | Teplota [°C] | Počet cyklov |
|----------------|-----------------------------------|--------------|
| 5 min | 94 | 1× |
| 30 s | 94 | 35× |
| 30 s | <i>zvolená teplota annealingu</i> | |
| 30s | 72 | |
| 7 min | 72 | 1× |
| Bez obmedzenia | 10 | 1× |

Všetky páry primerov boli testované pri základnej teplote annealingu 50 °C. V prípade monomorfneho produktu bola vzorka vyradená z ďalšieho testovania ak bol produkt polymorfny, jeho teplota annealingu a dĺžka elektroforézy bola upravovaná pokiaľ nebol výsledny produkt hodnotiteľny. V niektorých prípadoch až na teplotu 69 °C a dĺžku elektroforézy 3 hodiny. Ak sa produkt neobjavil, teplota bola znižovaná až na 44 °C.

4.3 Spracovanie PCR produktov

Produkty získané PCR boli ďalej spracované vo vyhrievanej elektroforetickej komôrke S2 Whatman Biometra s použitím skiel s rozmermi 330 × 390 mm a 330 × 420 mm s hrúbkou 0,4 mm gélu z 6 % polyakrylamidu 19:1.

Postup práce:

- Skla, ktoré boli použité na elektroforetickú separáciu, boli umyté vodou prípadne saponátom a následne opláchnuté deionizovanou vodou. Ďalší postup práce prebiehal v digestore.

- Menšie sklo bolo osušené papierovou utierkou a 2× ošetrené 96% etanolom. Na plochu, ktorá sa dotýkala gélu bolo nanosené molekulárne lepidlo a po 5 minútach bolo 4× opláchnuté 96% etanolom.

- Väčšie sklo bolo taktiež osušené papierovou utierkou a 2× ošetrené 96% etanolom. Na plochu, ktorá prilieha ku gélu bol nanosený odpudzovač vody, ktorý sa používa na ošetrovanie skiel v autách. Po 5 minútach bolo sklo 2× opláchnuté malým množstvom deionizovanej vody a osušené papierovou utierkou.

- Medzi takto ošetrené skla boli vložené dva spacersy o hrúbke 0,4 mm. Guma spacerov bola umiestnená tak aby tesne priliehala k hrane menšieho skla. Pripravené skla so spacerami boli zaistené štyrmi klipmi aby nalievajúci gél nevytekal a proti prípadnému pohybu.

- Do priestoru medzi skla bol naliaty 6 % polyakrylamidový gél a zasunutý hrebienok rovnou plochou do hĺbky cca 1cm. Hrebienok bol ku sklám zaistený štyrmi veľkými klipmi. Gél polymerizoval 50 - 60 minút.

- Po stuhnutí gélu boli klipy odobrané a prebytočný gél odstránený pomocou vody a štetky. Skla boli osušené a vložené menším sklom k vyhrievanej časti elektroforetickej komôrky tak aby hrebienok smeroval nahor. Skla boli zafixované skrutkami a hadička na odvod pufru uzavretá.

- Do vrchnej a spodnej časti komôrky bol naliaty 0,5× TBE pufor a hrebienok bol opatrne vytiahnutý. Priestor po hrebienku bol očistený od prebytočného gélu a za použitia striekačky bol tento priestor vymytý od nečistôt na rozhraní medzi gélom a pufrom.

- Elektroforetická komôrka bola napojená na zdroj jednosmerného prúdu, na ktorom boli nastavené hodnoty elektrického prúdu 150 mA, napätia 3 000 V a výkonu 90 W. Takto pripravené skla boli nahrievané 30 minút.

- Po uplynutí tohto času bol zdroj zastavený, okraj skla očistený od prebytočného gélu a hrebienok bol opäť zasunutý medzi skla, tak aby boli zúbky vnorené cca 1 mm do gélu. PCR produkt bol pred nanesením zmiešaný s nanášacím farbivom a bol denaturovaný v termocykleri pri teplote 95 °C po dobu 3 minút. Následne bol roztok prudko ochladený v ľade.

- Takto pripravené vzorky boli nanášané osemkanálovou mikropipetou medzi zúbky hrebienka a to v objeme 2 μ l.

- Po nanesení vzoriek bola elektroforetická komôrka opäť pripojená k zdroju jednosmerného prúdu, na ktorom boli nastavené hodnoty elektrického prúdu 150 mA, napätia 3 000 V a výkonu 70 W. Elektroforetická komôrka a sklá boli nahrievané po dobu 90 minút.

- V priebehu separácie boli nachystané roztoky fix/stop, 1% HNO₃ a vývojka, ktorá bola umiestnená do chladničky.

- Po uplynutí 90 minút bol zdroj jednosmerného prúdu vypnutý a odpojený. Ventil na zadržiavanie pufru bol uvoľnený, aby tak mohol vytečť z vrchnej časti elektroforetickej komôrky do spodnej.

- Skla s géлом boli odistené a prenesené na podložku, tak že väčšie sklo smerovalo nadol. Následne boli odstránené spacers a za pomoci nožika boli skla od seba oddelené. Väčšie sklo bolo umyte, opláchnuté, umiestnené do stojana a pripravené na ďalšie použitie.

- Menšie sklo s gélom bolo prenesené do misky a zaliate fix/stopom. Po dobu 20 minút bolo pretrepávané na trepačke.

- Po uplynutí tejto doby bol fix/stop zliaty a uschovaný pre ďalšie použitie. Sklo s gélom bolo v miske 3× premývané deionizovanou vodou cca 2 minúty. Následne bola miska umiestnená na trepačku a zaliata 1% HNO₃ maximálne na 5 minút. Potom bolo potrebné sklo s gélom 4× premyť deionizovanou vodou.

- Sklo s gélom bolo umiestnené do misky určenej pre roztok AgNO₃, do ktorého bol pridaný formaldehyd o objeme 1,2 ml. Po 30 minútach bol roztok zliaty do fľašky a uschovaný pre ďalšie použitie.

- Sklo s gélom bolo na 5 s ponorené v dopredu pripravenej miske s deionizovanou vodou. Potom bolo premiestnené do misky na trepačke, do ktorej bola naliata vývojka s 1,2 ml formaldehydom a 160 μ l thiosíranom sodným.

- Postupným zafarbovaním sa na skle s gélom objavovali bandy separované úseky DNA. Po dostatočnom stmavnutí bola reakcia zastavená pomocou fix/stopu. Keď sa prestali objavovať CO₂ bubliny bolo sklo opláchnuté v miske s vodou a umiestnené do sušiarne. Po vyschnutí gélu bolo sklo umiestnené na negatoskop a vyhodnotené.

4.4 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/ μ l), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modrá (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (100 mmol/l, 400 μ l každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan strieborný (Lachema)
- Etanol - 96% roztok (Lihovat Vrbátky)
- Etylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachema)
- Etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Lachema)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Chloroform (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová - ľadová (Lachema)
- Laurysýran sodný (SDS) (Lachema)
- 3 - metakryloxypropyltrimetoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N - lauroylsarkosin (Sigma)
- N, N - metylenbisakrylamid (Serva)

- N, N, N, N - tetrametyletylendiamin (TEMED) (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Proteináza K (Sigma)
- Rain Repellent - prípravok odpudzujúci vodu zo skiel automobilov (Turtle Wax Europe B.V.)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymetylaminometan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modrá(Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.5 Použité roztoky

Akrylamid (6% zásobný roztok)

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizovanej vody
- 50 ml 10× TBE
- 150 ml 40% zásobného roztoku akrylamid: N,N'- metylenbisakrylamid 19:1
- Po rozpustení všetkých zložiek prefiltrovaný a uložený v tmavej fľaške pri 4 °C

Polyakrylamidový gél (6%)

- 60 ml 6% zásobného roztoku akrylamidu
- 40 µl N,N,N',N'- tetrametyletylendiaminu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amónneho (NH₄)₂S₂O₈

Molekulárne lepidlo

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

Akrylamid:N,N'- metylenbisakrylamid 19:1 (40% zásobný roztok)

- 380 g akrylamidu
- 20 g N,N'- metylenbisakrylamidu
- rozpustiť v 500 ml deionizovanej vody a doplniť do objemu 1 l
- roztok uložiť v tmavej fľaške pri teplote 4 °C

Peroxodisíran amónny $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (10% zásobný roztok)

- 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ rozpustiť v 10 ml deionizovanej vody
- uchovať v chladničke pri 4 °C

Nanášací pufrovací roztok

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

TBE pufor (10× zásobný roztok)

- 108 g Tris
- 55 g kyseliny boritej H_3BO_3
- 40 ml roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplniť deionizovanou vodou na objem 1 l

Fix/stop roztok

- 88 ml ľadovej kyseliny octovej
- 800 ml deionizovanej vody

Kyselina dusičná HNO_3 (1% roztok)

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

Dusičnan strieborný AgNO_3 (0,1% roztok)

- 0,8 g AgNO_3
- 800 ml deionizovanej vody
- Pred použitím pridať 1,2 ml formaldehydu

Vývojka

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

4.6 Prístrojové vybavenie laboratória

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratórne váhy MARK S 622 (BEL Engineering)
- Magnetická miešačka MR Hei-Standard (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Finnpiette 0,5 µl až 10 µl (osemkanálová mikropipeta) (Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenčná elektroforetická komora S2 (Whatman Biometr)
- Sušiareň – sterilizátor CAT 8050 (Contherm)
- Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)
- Termocyklér GenePro (BIOER Technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér XP Thermal Cycler (BIOER Technology)
- Trepáčka Orbit 1900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)

5 Výsledky

6 Diskusia

7 Závěr

8 Zoznam skratiek

- A adenin
- bp pár báz (*base pair*)
- C cytozin
- DNA deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)
- ESTs krátke sekvenované úseky cDNA (*expressed sequence tags*)
- G guanin
- kb kilobáza
- PCR polymerázová reťazová reakcia (*polymerase chain reaction*)
- SSRs repetícia jednoduchých sekvencií (*simple sequence repeats*)
- SSTs krátke tandemové repetície (*short tandem repeats*)
- T tymin
- VNTRs variabilný počet tandemových repetícií (*variable number of tandem repeats*)

9 Použitá literatura

- Ahmed S, Hart T, Dawson DA, Horsburgh GJ, Trathan NP, Rogers AD (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*.
- Akst EP, Boersma PD, Fleischer RC (2002): A comparison of genetic diversity between the Gal'apagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3, 375-383.
- Anonymous (2014): Painted stork (*Mycteria leucocephala*), navštívěné dňa 04.08. 2014 na: <http://www.arkive.org/painted-stork/mycteria-leucocephala/>.
- Bennett P (2000): Demystified... Microsatellites. *Molecular Pathology* 53, 177-183.
- Billing TM, Guay P –J, Peucker J, Mulder RA (2007): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the study of paternity and population structure in the little penguin *Eudyptula minor*. *Molecular Ecology Notes*, 7, 425-427.
- Blackburn EH (1991): Structure and function of telomeres. *Nature*, 350, 569-573.
- Boessenkool S, King TM, Seddon PJ, Waters JM (2008): Isolation and characterization of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1043-1045.
- Brown LH, Urban EK, Newman K (1993): The birds of Africa. Vol. 1, Academic Press, London.
- Burnie D (Ed.) (2002): Zvíře. Knižní Klub, Praha.
- Campbell NA, Reece JB (2006): Biologie. Computer Press, Brno.
- Catasti P, Gupta G, Garcia AE, Ratliff R, Hong L, Yau P, Moyzis RK, Bradbury EM (1994): Unusual Structures of the Tandem Repetitive DNA Sequences Located at Human Centromeres. *Biochemistry*, 33, 3819-3830.
- Dai Y, Zhou X, Fang W, Lin Q, Chen X (2013): Development and cross-species transferability of 23 microsatellite markers from the vulnerable Chinese Egret (*Egretta eulophotes*) using 454 sequencing. *Conservation Genetics Resources* 5, 1035-1038.
- Dakin EE, Avise JC (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504-509.
- Daniels J, Holmans P, Williams N, Turic D, McGuffin P, Plomin R, Owen MJ (1998): A simple method for analyzing microsatellite allele image patterns generated from DNA pools and its application to allelic association studies. *The American Journal of Human Genetics* 62, 1189-1197.

Dawson DA, Ball AD, Spurgin LG, Martín-Gálvez D, Stewart IRK, Horsburgh GJ, Potter J, Molina-Morales M, Bicknell AWJ, Preston SAJ, Ekblom R, Slate J, Burke T (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 1-22.

Dawson DA, Horsburgh GJ, Küpper C, Stewart IK, Ball AD, Durrant KL, Hansson B, Bacon I, Bird S, Klein Á, Krupa AP, Lee J, 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 cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475-494.

del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona.

Ellegren H (2004): Microsatellites simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5, 435-445.

Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.

Flegl J (2009): Evoluční biologie, 2. opravené a rozšířené vydání. Academia, Praha.

Gaisler J, Zima J (2007): Zoologie obratlovců, 2. přepracované vydání. Academia, Praha.

Galbusera P, van Dongen S, Matthysen E (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics*, 1, 163-168.

Glenn TC, Schable NA (2005): Isolating microsatellite DNA loci. In: *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B* (eds Zimmer EA, Roalson EH), pp. 202–222. Elsevier Academic Press, San Diego, California.

Goodman SJ (1998): Patterns of extensive genetic differentiation and variation among European harbor seals (*Phoca vitulina*) revealed using microsatellite DNA polymorphisms. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 104-118.

Gosler A (1994): Atlas ptáků světa. Příroda a. s, Bratislava.

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

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

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.

Hudec K, Černý W (1972): Fauna ČSSR, Ptáci 2, Academia, Praha.

- Hudec K, Šťastný K (1994): Fauna ČR a SR, Ptáci, 2. přepracované a doplněné vydání. Academia, Praha.
- Humple DL (2009): Genetic structure and demographic impacts of oil spills in wester and Clark's grebes. Diplomová práce, Depon. in: Sonoma State University, Rohnert Park.
- Chapuis MP, Estoup A (2007): Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621-631.
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert AM (2006): Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1-29.
- Itsko M, Ben-Dov E, Rabinovitch A, Zaritsky A (2011): Propagation in the Microgene Polymerization Reaction and *in vivo*. *Application of Thermodynamics to Biological and Materials Science*, 175-202.
- Labuschagne Ch, van Wyk AM, Kotze A, Grobler P, Dalton DL (2013): Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). *Conservation Genet Resour*, 5, 169-171.
- Lai Y, Sun F (2003): The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution* 20, 2123-2131.
- Litt M, Luty JA (1989): A hypercvariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics.*, 44, 397-401.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294-307.
- Perrin C, Roy MS (2000): Rapid and efficient identification of microsatellite loci from the sea urchin, *Evechinus chloroticus*. *Molecular Ecology*, 9, 2221-2223.
- Roeder AD, Marshall RK, Mitchelson AJ, Visagathilagar T, Ritchie PA, Love DR, Pakai TJ, McPartlan HC, Murray ND, Robinson NA, Kerry KR, Lambert DM (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10, 1645-1656.
- Scribner KT, Pearce JM (2000): Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. *Molecular Methods in Ecology*, 235-273.

- Shikano T, Ramadevi J, Shimada Y, Merilä J (2010): Utility of sequenced genomes for microsatellite marker development in non-model organisms: a case study of functionally important genes in nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*). *BMC Genomics*, 11, 1-13.
- Schlosser JA, Dubach JM, Garner TWJ, Araya B, Bernal M, Simeone A, Smith KA, Wallace RS (2008): Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin. *Spheniscus humboldti*. *Conserv Genet*.
- Schlosser JA, Garner TWJ, Dubach JM, McElligott AG (2003): Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, 3, 62-64.
- Snustad DP, Simmons MJ (2012): Genetics. Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc., Singapore.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros, Praha.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (2006): Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice 2001-2003. Aventinum, Praha.
- Ugarkovic D, Plohl M (2002): Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *The EMBO Journal*, Vol. 21 No. 22, 5955-5959.
- Vergnaud G, Deneud F (2000): Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Research* 10, 899-907.
- Volf J, Filex J (1997): Ještě žijí.... Academia, Praha.
- Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus VWA. *Nucleic Acids Research*, 24, 2807-2812.
- Weber JL, May PE (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44, 388.
- Wolfsberg TG, Landsman D (2001): Expressed sequence tags (ESTs), navštívené dňa 03.08.2014 na: <http://www.bioon.com/book/biology/Bioinformatics/chapter-12.pdf>.
- Yee ES, Zainuddun ZZ, Ismail A, Yap ChK, Tan SG (2013): Molecular sex identification of painted storks (*Mycteria leucocephala*): using FTA cards, horizontal PAGE and quick silver staining. *Journal of Genetics*, 92, e15-e18.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.

Zhao X, Si Y, Hanson RE, Crane ChF, Price HJ, Stelly DM, Wendel JF, Paterson AH (1998): Dispersed Repetitive DNA Has Spread to New Genomes Since Polyploid Formation in Cotton. *GENOME RESEARCH*, 8, 479-492.

Zima J, Macholán M, Munclinger P, Piálek J (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.