

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u plameňáka karibského
(*Phoenicopterus ruber*)**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Buržáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s pomocí uvedených literárních zdrojů pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D.

V Olomouci

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho ochotu a čas, který mi věnoval při psaní diplomové práce, a za jeho odbornou pomoc při jejím praktickém provedení. Děkuji také kolegyním z laboratoře populační genetiky i rodině za podporu a trpělivost.

Souhrn

V této diplomové práci se zabývám analýzou a charakteristikou polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), které by mohly být využity jako markery pro populační i paternitní studie.

V teoretické části diplomové práce řeším problematiku systematického zařazení plameňáků, věnuji se popisu jejich života a ochrany, dále se zabývám charakteristikou mikrosatelitů a jejich využitím v ornitologických studiích a nakonec se zaměřuji na různé metody získávání mikrosatelitů od plameňáků a jim příbuzných druhů ptáků.

V praktické části práce jsem testovala a charakterizovala mikrosatelity pomocí polymerázové řetězové reakce s využitím *cross-species* primerů odvozených z DNA druhů z řádu Phoenicopteriformes, Ciconiiformes a Pelecaniformes. PCR produkty jsem podrobila separaci v polyakrylamidové gelu a z výsledných elektroforetogramů jsem odečetla alelové konstituce, které jsem nakonec podrobila statistické analýze.

Celkově jsem pro plameňáka karibského charakterizovala 42 nových polymorfních mikrosatelitových lokusů s počtem alel od 2 do 25. Pět z těchto lokusů jsem doporučila pro paternitní studie.

Summary

In this master thesis I deal with the analysis and characterization of polymorphic microsatellite loci in Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber*), which could be used as markers for population and paternity studies.

In the theoretical part of the thesis I solve the issue of systematic inclusion of flamingos, I deal with the description of their life and protection, further I deal with the characteristics of microsatellites and their usage in ornithological studies, and finally I focus on the various methods of obtaining microsatellites from flamingos and their related species of birds.

In the practical part of the thesis I tested and characterized microsatellites by polymerase chain reaction using cross-species primers derived from the DNA of species from the order of Phoenicopteriformes, Ciconiiformes and Pelecaniformes. I electrophoretically separated PCR products in a polyacrylamide gel and I set allele constitutions from resulting electrophoretograms, which I finally statistically analysed.

Overall, I characterized 42 new polymorphic microsatellite loci for Caribbean flamingo with the number of alleles from 2 to 25. I recommended five of these loci for paternity studies.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíle práce	8
3	Literární přehled	9
3.1	Problematika taxonomického zařazení plameňáků.....	9
3.2	Řád plameňáci.....	10
3.3	Čeleď plameňákovití.....	13
3.3.1	Plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>).....	14
3.4	Ohrožení a ochrana plameňáků.....	16
3.5	Mikrosatelity	18
3.6	Využití mikrosatelitů	19
3.6.1	Využití mikrosatelitů v ornitologických studiích	19
3.6.2	Studium polymorfních mikrosatelitů u plameňáků pomocí <i>cross-species</i> PCR amplifikace.....	20
3.6.2.1	Studium polymorfních mikrosatelitů u plameňáka růžového.....	20
3.6.2.2	Studium polymorfních mikrosatelitů u plameňáka karibského	21
3.6.3	Analýza a charakteristika mikrosatelitů u plameňáků <i>de novo</i>	24
3.6.4	<i>De novo</i> izolace a <i>cross-species</i> PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů u druhů z řádu brodivých	26
3.6.4.1	<i>De novo</i> izolace a <i>cross-species</i> PCR amplifikace mikrosatelitů u volavky rusohlavé.....	27
3.6.4.2	<i>De novo</i> izolace a <i>cross-species</i> PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů u čápa východního	27
4	Materiál a metody	29
4.1	Materiál	29
4.2	PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů.....	29
4.3	Zpracování PCR produktů	30
4.4	Statistické vyhodnocení mikrosatelitů a analýza vazby.....	31
4.5	Použité chemikálie	32
4.6	Použité roztoky	33
4.7	Použité laboratorní přístroje.....	35
5	Výsledky	37
6	Diskuze	46
7	Závěr	56
8	Seznam zkratk	57
9	Použitá literatura	58
10	Příloha	63

1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice s repetitivní jednotkou dlouhou pouze několik párů bází. Jejich častý výskyt v nekódujících i kódujících sekvencích genomů prokaryotických i eukaryotických organismů, kodominance a vysoký alelový polymorfismus z nich dělají jedny z nejpoužívanějších genetických markerů. Uplatnění mají nejen v evolučních a populačních studiích, ale používají se i při určování paternity, v kriminalistice a při genetickém mapování.

U plameňáka karibského byly již popsány mikrosatelitové lokusy pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace ve dvou bakalářských a jedné diplomové práci. Drobek (2008) testoval mikrosatelitové lokusy odvozené z DNA vybraných druhů z řádů veslonozí, brodiví a potápky a našel 10 polymorfních lokusů pro plameňáka karibského. Drobek (2010) u plameňáka karibského testoval mikrosatelitové lokusy odvozené z dalších druhů z řádů veslonozí, brodiví, potápky, potáplice, dlouhokřídli, vrubozobí a tučňáci. Nalezl 25 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Matošková (2011) testovala u plameňáka karibského mikrosatelitové lokusy odvozené z DNA vybraných druhů z řádů plameňáci, veslonozí a brodiví a našla 35 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Tato diplomová práce se bude zabývat analýzou a charakteristikou 35 mikrosatelitových lokusů označených jako polymorfní u plameňáka karibského v práci Matošková (2011). U každého polymorfního lokusu bude stanoven počet alel a provedena genotypizace na 30 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského. Data budou vyhodnocena na PC pomocí populačně genetických programů. Také bude provedena *cross-species* PCR amplifikace DNA plameňáka karibského pomocí primerů odvozených od volavky rusohlavé a čápa východního, druhů, jejichž mikrosatelity dosud nebyly na polymorfismus u plameňáků testovány. Získané polymorfní lokusy budou podrobeny genotypizaci a též vyhodnoceny.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Amplifikace a charakteristika polymorfních mikrosatelitových lokusů na DNA nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Jedná se o lokusy označené jako polymorfní v bakalářské práci Terezy Matoškové (2011).
4. Zjistit, zda mezi těmito lokusy, které jsem popsala jako polymorfní, není vazba a zda není vazba mezi některými těmito lokusy a lokusy popsanými jako polymorfní v diplomové práci Aleše Drobka (2010).

3 Literární přehled

3.1 Problematika taxonomického zařazení plameňáků

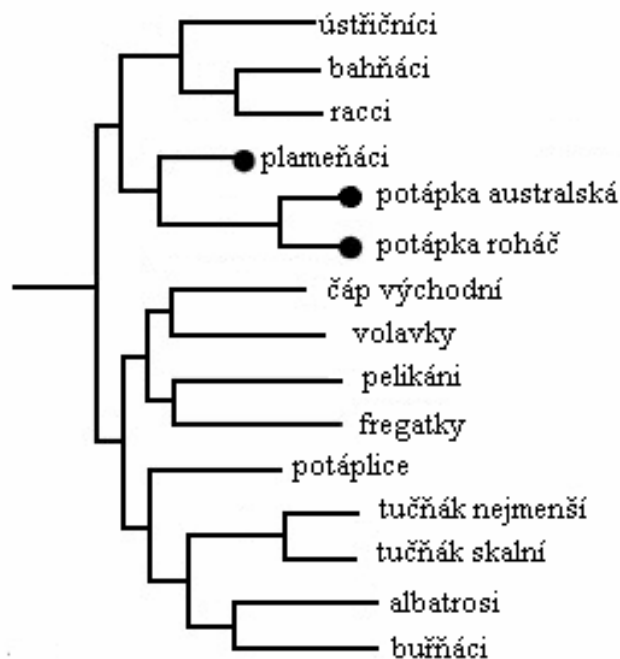
Plameňáci tvoří jeden z nejstarších řádů třídy ptáků. Třetihorní fosílie z období oligocénu staré 30 miliónů let jsou shodné s dnešními druhy plameňáků (del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998). Tyto fosílie byly nalezeny v Americe, Evropě a dokonce i v Austrálii, kde dnes plameňáci nežijí (del Hoyo *et al.*, 1992; Alderton, 1995). Gaisler (1983) dokonce uvádí, že řád Phoenicopteriformes je doložen již od spodní křídy.

Taxonomické zařazení plameňáků je stále nejisté. Pohledy na jejich fylogenezi jsou rozmanité a stále není k dispozici systematické zařazení, které by bylo ustálené (Gaisler *et Zima*, 2007).

Podle Gaislera (1983) byli plameňáci dříve řazeni mezi brodivé i mezi vrubozobé. Del Hoyo *et al.* (1992) zase uvádějí, že plameňáci by měli patřit do podřádu řádu brodiví (Ciconiiformes), jelikož jsou v jistých ohledech brodivým ptákům podobní. S čápy sdílejí plameňáci podobnou anatomii jako je tvar pánve a žeber, s volavkami mají shodné proteiny vaječného bílku (del Hoyo *et al.*, 1992; Alderton, 1995). Naopak můžeme také pozorovat podobnost mezi plameňáky a řádem vrubozobí (Anseriformes). Jde obzvláště o podobnost s husami, které mají stejně jako plameňáci plovací blány, podobnou strukturu zobáku, chování a hlas mláďat (del Hoyo *et al.*, 1992). S husami a kachnami sdílejí také společné parazity a kejhání za letu (Alderton, 1995). Kvůli těmto důvodům dnes plameňáci tvoří samostatný řád Phoenicopteriformes s jedinou čeledí Phoenicopteridae. Studie z osmdesátých let ale začaly poukazovat na možnou podobnost plameňáků s ústříčníky, tenkozobci a pisilami, druhy z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes). Tyto studie jsou založeny na fosilních důkazech i na podobnosti v anatomii a v chování plameňáků a pisily australské. To vedlo k návrhu, aby se plameňáci stali čeledí řádu dlouhokřídlí. Podobnost s řádem brodiví začala být připisována konvergenční evoluci (del Hoyo *et al.*, 1992). Podle paleontologických nálezů (Veselovský, 2001) jsou plameňáci příbuzní bahňákům, podřádu řádu dlouhokřídlí.

Del Hoyo *et al.* (1992) také uvádějí, že studie příbuznosti plameňáků s ostatními druhy ptáků využívaly molekulárních metod založených např. na DNA-DNA hybridizaci. Takto byla potvrzena příbuznost plameňáků s čápy a ibisy, ale také

s pelikány a dokonce i s kondory. Podobnost s řádem vrubozobí se začala připisovat více analogii než příbuznosti. Proti tomuto faktu stály výsledky z analýzy žlučových kyselin, které řadily plameňáky spíše k vrubozobým, z nichž jsou jim nejpříbuznější bernešky. Podobnost ve struktuře žlučových kyselin byla považována za důležité kritérium pro posouzení evolučně biologických vztahů mezi obratlovci. Výsledky analýzy žlučových kyselin vylučují možnost řazení plameňáků do řádu brodiví nebo dlouhokřídli (del Hoyo *et al.*, 1992). Tyto názory jsou dnes již vyvráceny díky novým metodám analýz mitochondriálních genomů ptáků. Autoři Morgan-Richards *et al.* (2008) a Hackett *et al.* (2008) považují plameňáky za sesterskou skupinu potápek (Podicipediformes). Za jejich další nejbližší příbuzný řád uvádějí dlouhokřídle, kam patří druhy jako racek, bahňák apod. a dále konglomerát řádů brodiví, veslonozí, potáplice, tučňáci a trubkonosí (viz Obrázek 1) (Morgan-Richards *et al.*, 2008).



Obrázek 1: Kladogram zahrnující nejpříbuznější druhy plameňáků. Evoluční vztahy jsou založeny na maximální pravděpodobnostní analýze mitochondriálních sekvencí. Černými tečkami jsou označeni plameňáci a jejich nejpříbuznější druhy (Morgan-Richards *et al.*, 2008).

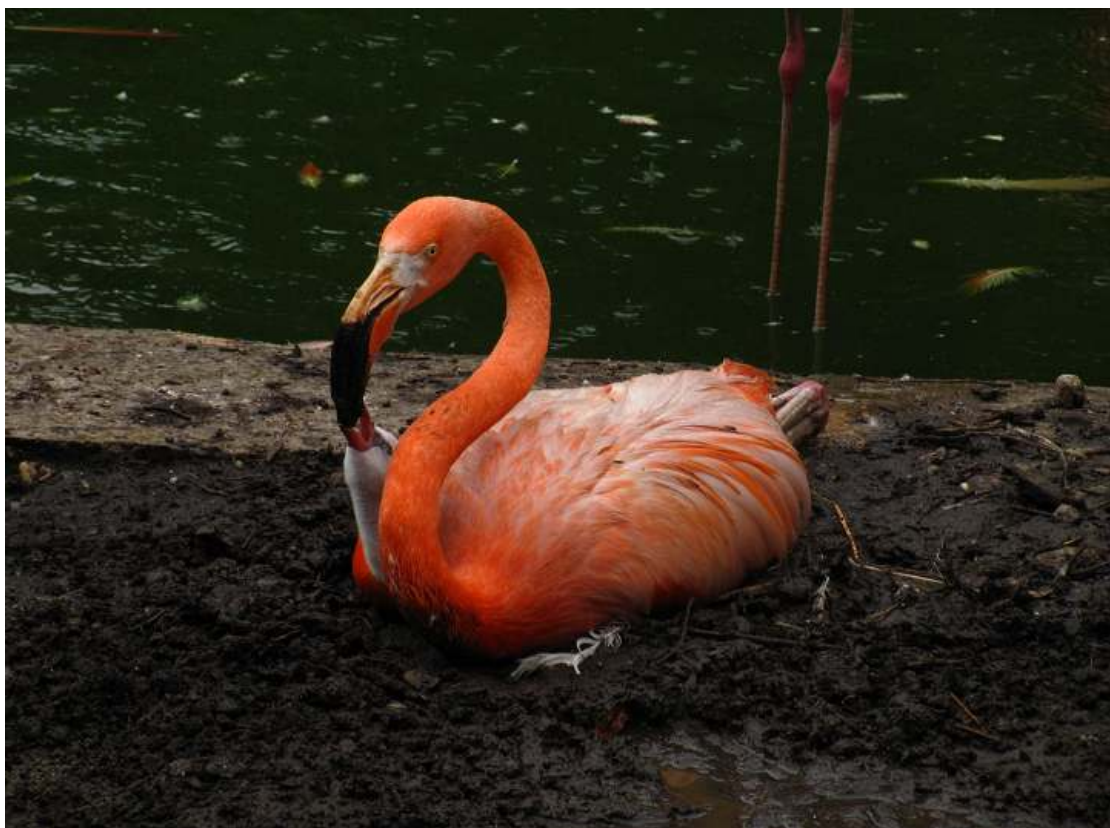
3.2 Řád plameňáci

Plameňáci (Phoenicopteriformes) jsou velcí vodní ptáci typičtí svou růžovou barvou, velkým zahnutým zobákem, dlouhýma nohama a krkem, který tvoří 17 obratlů.

Neopeřené dlouhé nohy mají mezi třemi prsty plovací blánu, což umožňuje plameňákům nejen běh a chůzi v hluboké vodě, ale i plavání (Šťastný *et al.*, 1998). Jejich zobák s malou horní a velkou dolní čelistí je adaptovaný na filtrování potravy (del Hoyo *et al.*, 1992; Alderton, 1995). Je zahnutý dolů v tupém úhlu a jeho okraje lemují rohovitě destičky neboli lamely s vláskovitým povrchem, kterými si plameňáci cedí potravu (Alderton, 1995; Šťastný *et al.*, 1998). Tyto rohovité lamely se nacházejí na horní i dolní čelisti, kde tvoří dvě řady (Gaisler *et Zima*, 2007). Při cezení potravy si kromě lamel pomáhají i jazykem s masitými výběžky. Potravu získávají z bahnitého dna tak, že horní stranou zobáku jezdí po dně a víří bahno. Zvířenou vodu procedí mezerami rohovitých destiček (Hanzák *et Hudec*, 1963). Pohyb jazyka vpřed a vzad funguje jako pumpa pro vytlačení vody a na vláskovitém povrchu lamel se zachytí složky potravy, které následně plameňák spolkne (Šťastný *et al.*, 1998). Zobák je u každého druhu plameňáků adaptovaný jinak. Větší druhy jím zachycují větší potravu jako korýše, měkkýše a hmyz, menší druhy díky hustším lamelám dokonce i plankton a mikroskopické řasy. Potravu sbírají většinou na mělčinách, ale někteří plameňáci za ní i plavou (Hanzák *et Hudec*, 1963). Odlišné uspořádání filtru je pro druhy výhodou, jelikož se mohou živit na stejných místech a nekonkurovat si (Šťastný *et al.*, 1998). Z potravy získávají karotenoidy, díky nimž jsou zbarveni růžově. Jde o alfa a beta karotenoidní pigmenty, např. canthaxanthin, které pocházejí hlavně ze zelených řas, hmyzu a korýšů (Kapil, 2005).

Obývají všechny kontinenty až na Austrálii a Antarktidu (del Hoyo *et al.*, 1992). V Evropě vytvářejí kolonie ve Španělsku a ve Francii (Šťastný, 1998). Občas zavítají i do České republiky (Hanzák *et Hudec*, 1963). Všichni plameňáci se ale přirozeně vyskytují v tropických a subtropických oblastech. Většinou jde o nepříliš migrující ptáky, hnízdiště mohou ovšem změnit v důsledku změn klimatu (Kapil, 2005). Žijí ve velkých koloniích u brakických a slaných vod (Svensson *et Grant*, 2004). Obývají jak mořská pobřeží, tak i horské oblasti s nadmořskou výškou 5 000 metrů (del Hoyo *et al.*, 1992). Zajímavostí je, že mohou obývat nejen silně zásaditá a slaná jezera, ale i jezera s horkou až skoro vařící vodou, která jsou bohatá na řasy a rozsivky a poskytují tak plameňákům zásobu potravy (Šťastný *et al.*, 1998). Plameňáci nehnízdí každý rok. Hnízdo si stavějí z bláta do tvaru homole (Svensson *et Grant*, 2004) na bahnitých březích popřípadě v mělké vodě. Na 1 vzácněji na 2 vejcích se střídají oba rodiče. Mláďata se líhnou po 30 dnech a po 4 dnech opouštějí hnízdo (Hanzák *et Hudec*, 1963), aby vytvořili skupinky mláďat, o které se dospělí starají společně (Alderton, 1995).

Nízký počet mláďat je pro rodiče výhodou, jelikož zajišťuje větší šanci na přežití mláďat i rodičů (Geraci *et al.*, 2012). Mláďata mají zprvu rovný zobák, který se jim začne zakřivovat až po třech týdnech. Rodiče je živí po dobu 14 dnů vyvrhovaným sekretem (viz Obrázek 2), poté začnou sama shánět potravu (Hanzák *et Hudec*, 1963). Tento sekret se produkuje ve voleti rodičů a spouštěcím podnětem pro jeho tvorbu mohou být hlasy mláďat.



Obrázek 2: Plameňák karibský (*Phoenicopterus ruber*) krmící mládě vyvrhovaným sekretem, fotografie pořízena v ZOO Ostrava, autor Tomáš Krajča.

Zajímavostí je, že sekret mohou produkovat také starší i mladší ptáci, kteří nejsou rodiči, a přikrmovat tak sousední mláďata (Alderton, 1995). Sekret je červený, obsahuje 8 % bílkovin, 18 % tuků, 1 % cukrů, 2-3 % červených krvinek (Veselovský, 2001) a jeho barviva se ukládají v játrech mláďat (Alderton, 1995). Jeho produkci řídí hormon prolaktin, stejný hormon, který ovlivňuje produkci savčího mléka (Anonymous, 2012).

Podle Aldertona (1995) jeden pár plameňáků spolu může žít celý život. Naopak Geraci *et al.* (2012) uvádějí, že druh plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*) se během jednoho hnízdního období páří jen s jedním partnerem, v dalším hnízdním období

partnera střídá. Ve volné přírodě se plameňáci mohou dožít až 40 let, ovšem jsou známy případy ze zajetí, kdy se někteří jedinci dožili až 70 let (Geraci *et al.*, 2012). Nejstarší plameňák na světě pochází z australské ZOO v Adelaide a přesáhl věk 75 let (Anonymous, 2012).

V dobách antiky byli plameňáci často loveni kvůli jejich jazyku, který byl považován za pochoutku (Alderton, 1995).

3.3 Čeled' plameňákovití

Čeled' plameňákovití (Phoenicopteridae) je jedinou čeledí řádu plameňáci, do které patří 3 rody plameňáků: *Phoenicopterus*, *Phoeniconaias* a *Phoenicoparrus*, které tvoří celkem 5 druhů plameňáků. Rod *Phoenicopterus* představuje 2 druhy. Prvním je plameňák růžový (*Phoenicopterus ruber*), který tvoří 2 geograficky separované poddruhy: plameňáka růžového (*Phoenicopterus ruber roseus*), který žije v jižní Evropě, Africe a Asii a plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber ruber*), který obývá střední Ameriku a Galapágy. Populace plameňáka karibského žijící na Galapágách je občas označována jako samostatný poddruh s názvem plameňák galapážský (*Phoenicopterus ruber glyphorhynchus*). Je tak označován na základě velikosti, zbarvení a hnízdění v malých koloniích. Dalším druhem rodu *Phoenicopterus* je plameňák chilský (*Phoenicopterus chilensis*) žijící v Jižní Americe. Plameňák chilský má odlišnější chování oproti třem zmíněným poddruhům rodu *Phoenicopterus*, a proto je považován za plnohodnotný druh (del Hoyo *et al.*, 1992). Starší literatura ovšem plameňáka chilského považuje za poddruh plameňáka růžového (*Phoenicopterus ruber*), který tvoří tři vyhraněné zeměpisné rasy neboli poddruhy: plameňáka růžového starosvětského (*Phoenicopterus ruber roseus*), plameňáka růžového tmavého (*Phoenicopterus ruber ruber*) a zmíněného plameňáka růžového chilského (*Phoenicopterus ruber chilensis*) (Hanzák *et Hudec*, 1963). Do rodu *Phoeniconaias* patří jen jeden druh s názvem plameňák malý (*Phoeniconaias minor*) obývající východní Afriku a severozápadní Indii. Do rodu *Phoenicoparrus* patří dva druhy, plameňák andský (*Phoenicoparrus andinus*) žijící ve vysokohorských oblastech Jižní Ameriky a plameňák Jamesův (*Phoenicoparrus jamesi*) žijící na malém území v Andách. Del Hoyo *et al.* (1992) dále plameňáky rozděluje do dvou skupin podle struktury zobáku. Do jedné skupiny patří plameňák růžový a plameňák chilský, kteří mají relativně primitivní ústrojí pro přijímání potravy. Do druhé skupiny patří plameňák malý, plameňák andský a plameňák Jamesův, jejichž ústrojí je více specializované.

Základním rozdílem mezi rody *Phoeniconaias* a *Phoenicoparrus* je přítomnost nebo nepřítomnost zadního prstu.

3.3.1 Plameňák karibský (*Phoenicopterus ruber*)

Podle del Hoyo *et al.* (1992) a Svensson *et Grant* (2004) je *Phoenicopterus ruber* česky označován za plameňáka růžového. *Phoenicopterus ruber roseus* je brán jako jeho evropský poddruh a *Phoenicopterus ruber ruber* za jeho karibský poddruh. Někteří autoři se spíše přiklánějí k tomu, aby byli plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*) a plameňák karibský (*Phoenicopterus ruber*) bráni za samostatné druhy (Anonymous, 2012; Geraci *et al.*, 2012).

Systematické zařazení druhu plameňák karibský (Anonymous, 2013a)

říše:	živočišná (Animalia)
oddělení:	dvoustranně souměrní (Bilateria)
pododdělení:	druhoústí (Deuterostomia)
kmen:	strunatci (Chordata)
podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
nadtřída:	čtyřnožci (Tetrapoda)
třída:	ptáci (Aves)
podtřída:	praví ptáci (Ornithurae)
nadřád:	letci (Neognathae)
řád:	plameňáci (Phoenicopteriformes)
čeleď:	plameňákovití (Phoenicopteridae)
rod:	plameňák (<i>Phoenicopterus</i>)
druh:	plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>)

Plameňák karibský je ze všech plameňáků nejvýrazněji zbarvený, na rozdíl od světle zbarveného plameňáka růžového má plameňák karibský jasně růžovou barvu. Za letu je jeho krk lehce prohnutý až skoro natažený. Vydává hlasitě skřehotavé zvuky (Svensson *et Grant*, 2004). Je největším ze všech druhů plameňáků. Dorůstá výšky až 145 cm, váží 2-4 kg, rozpětí křídel se pohybuje od 140 do 165 cm. Samice je menší a má kratší nohy než samec (del Hoyo *et al.*, 1992). Samec typické růžové zbarvení získává později než samice. Obě pohlaví jsou v dospělosti zbarvena stejně jasně růžovou barvou. Černě zbarvené letky jsou viditelné pouze za letu (Anonymous, 2012).



Obrázek 3: Plovoucí plameňáci karibští (*Phoenicopterus ruber*).
Zdroj: <http://www.flickr.com/photos/sexecutioner/3447751747/>

Žije v Karibiku a na Galapágách. Hnízdí v koloniích čítajících kolem 20 000 párů, naopak na Galapágách tvoří plameňáci malé kolonie o 100 jedincích. Hnízdí v květnu nejčastěji u ústí řek, na ostrůvcích vodních ploch, občas na skalnatých nebo písčinych ostrovech. Hnízdo staví z bláta do tvaru komolého jehlanu, na skalnatých ostrovech ho staví z kamenů a sutě (del Hoyo *et al.*, 1992). Aby byla hnízda chráněna před zaplavením, jsou až 30 cm vysoká (Alderton, 1995). Na stavbě hnízda i na zahřívání vajec, která velikostí odpovídají grapefruitu a jsou bílé barvy, se podílí pár společně (Anonymous, 2012). Z jednoho, vzácněji ze dvou vajec se po 32 dnech klubou šedá mláďata, která ve věku 5-6 let sexuálně dospívají (del Hoyo *et al.*, 1992). Mláďata se nelíhnou slepá, ale prvních 8 dní jsou plně závislá na rodičích, kteří je krmí. Po té začnou vytvářet s ostatními mláďaty v kolonii "ptačí jesle". Ve věku dvou týdnů se mláďatům začne vyvíjet specializovaný zobák a ve věku dvou až tří měsíců už mohou létat. Plameňáci karibští jsou monogamní ptáci. Výměna partnera probíhá až po smrti jednoho z páru (Anonymous, 2012).

Jejich potrava je velice různorodá. Živí se vodními korýši, měkkýši, kroužkovci, larvami nebo kuklami hmyzu. Z rostlinné stravy konzumují semínka nebo výhonky bahenních rostlin, tlející listy, vodní řasy nebo rozsivky. Jídelníček si příležitostně

mohou zpestřit dospělým hmyzem, např. mravenci nebo brouky, dále kraby a dokonce i rybami. Aby získali bakterie, polykají bahno. Krmí se s hlavou ponořenou, potravu filtrují z povrchu vody jen občas (del Hoyo *et al.*, 1992). Za potravou dokáží i plavat (viz Obrázek 3).

Patří mezi částečně migrující druhy. Pokud se výrazně změní klimatické podmínky, mohou za noc uletět až 600 km. Během hnízdění přelétávají pouze v případě, aby sehnali potravu. Malá populace plameňáků na Galapágách je nestěhovavá (del Hoyo *et al.*, 1992).

Plameňák karibský má jen několik přirozených predátorů. Jsou jimi kondoři, divoká prasata, lišky a jezevci. Plameňák je také loven lidmi pro maso a vejce (Anonymous, 2012).

3.4 Ohrožení a ochrana plameňáků

Podle mezinárodní unie pro ochranu přírody (IUCN) mají populace většiny druhů plameňáků klesající tendenci a jsou tak náchylné k ohrožení a situace druhu plameňák andský (*Phoenicoparrus andinus*) vzhledem k pokračujícímu prudkému poklesu populace a kvality jejích stanovišť je z nich nejhorší, stav *Phoenicopterus ruber* a *Phoenicopterus roseus* je poměrně dobrý (Anonymous, 2013b) (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Stav ohrožení plameňáků podle IUCN (Anonymous, 2013b).

Druh	Kategorie podle IUCN	Trend změny počtu
<i>Phoenicopterus ruber</i>	Málo dotčený	Rostoucí
<i>Phoenicopterus roseus</i>	Málo dotčený	Rostoucí
<i>Phoenicopterus chilensis</i>	Náchylný k ohrožení	Klesající
<i>Phoeniconaias minor</i>	Náchylný k ohrožení	Klesající
<i>Phoenicoparrus andinus</i>	Zranitelný	Klesající
<i>Phoenicoparrus jamesi</i>	Náchylný k ohrožení	Klesající

Podle del Hoya *et al.* (1992) žádný z pěti druhů plameňáků není globálně ohrožený. Může ale docházet k ohrožení jednotlivých kolonií. Plameňáci jsou citliví na znečištění zdrojů potravy. Je znám případ ze Španělska, kdy byli plameňáci vystaveni působení toxických sinic, které se nacházely v jejich potravě. V důsledku toho došlo k úhynu mnoha dospělých jedinců (Anonymous, 2012).

Podle del Hoya *et al.* (1992) se v Karibské oblasti nacházejí 4 velké chráněné kolonie plameňáka karibského, a to v Mexiku, na Kubě, Bahamách a Holandských Antilách. Populace čítající 80 000 až 90 000 jedinců značně klesla kvůli těžbě soli, která

se rozšířila v Mexiku v osmdesátých letech 20. století. Vznikaly tak solné pánve hlavně v oblasti Yucatanu, což mělo za následek eliminaci dvou ze tří hnízdní oblastí plameňáků. K částečné redukci přirozeného prostředí došlo i na ostrově Bonaire, což je jeden z ostrovů Holandských Antil, kde bylo znemožněno plameňákům hnízdit. Organizace IUCN uvádí, že populace plameňáka karibského v dnešní době roste (Anonymous, 2013b). Podle Wiedenfeld *et Jimémez-Uzcátegui* (2008) je plameňák karibský v Ekvádoru považován za ohrožený druh, i když globálně ohrožen není. Galapážská populace plameňáků, která dle del Hoya *et al.* (1992) celkem čítala 500 jedinců, může být ohrožena přírodními katastrofami. Autoři Wiedenfeld *et Jimémez-Uzcátegui* (2008) uvádějí celkový počet plameňáků na Galapágách mezi 320 až 550 jedinci, jejichž predátory jsou zejména prasata.

Plameňák růžový vytvářel celkově 25 široce oddělených kolonií. V Indii byl počet plameňáků odhadován na 500 000. V roce 1990 bylo v Íránu napočítáno 65 000 těchto ptáků. Populace plameňáka růžového v západním středomoří v roce 1983 čítala 80 000 jedinců a díky ochraně se značně zvyšovala (del Hoyo *et al.*, 1992). Ve středomoří se 5 z 9 hnízdicích kolonií nachází v oblasti solných pánví. Nejdůležitější hnízdicí kolonie se nachází v Camargue v jižní Francii u velké solné pánve, kde od šedesátých let hnízdí na 10 000 párů plameňáků. Změna tohoto prostředí může negativně ovlivnit celou kolonii (Béchet *et al.*, 2009). Celková velikost populace je dnes odhadována na 500 000 jedinců (Geraci *et al.*, 2010).

Plameňák chilský je rozšířený nejen v Chile, ale i v Argentině, Peru a Bolívii. Počty těchto ptáků se ovšem rapidně snižují z důvodu sběru vajec. V Bolívii sběrači vajec částečně nebo úplně zodpovídají za hnízdní neúspěchy kolonií plameňáků chilských. V 70. letech se na území jižní Ameriky nacházelo 500 000 těchto ptáků, v 90. letech už jen 200 000. Značný pokles plameňáků byl zaznamenán také v Chile a Argentině kvůli změnám životního prostředí. V kordobské laguně Mar Chiquita před zaplavením dříve hnízdilo kolem 30 000 ptáků (del Hoyo *et al.*, 1992).

Plameňák malý patřil mezi nejpočetnější druh plameňáka, jeho celková populace zahrnovala kolem 4 000 000 až 6 000 000 jedinců žijících v Africe i v Asii (del Hoyo *et al.*, 1992). Dnes v Africe vytváří tři velké kolonie, které vyžadují ochranu (Anonymous, 2013c). Na jezeře Natron se nachází jediná východoafrická kolonie čítající až 1 000 000 ptáků, která dnes tvoří 75 % světové populace. Jezeru Natron hrozí výstavba závodu pro těžbu sody, což by narušilo přirozené životní prostředí

pro plameňáky. Následkem by byl úbytek sinic, hlavní potravy plameňáků malých, kteří by kvůli ztrátě zdroje potravy opustili svá hnízdiště (Rands, 2007).

Plameňák andský a plameňák Jamesův jsou dle del Hoyo *et al.* (1992) klasifikováni jako téměř ohrožené druhy. IUCN ale plameňáka andského již řadí mezi zranitelné druhy (Anonymous, 2013b). Oba druhy žijí v Chile, Argentíně a Bolívii, kde každý tvoří populaci asi 50 000 jedinců. Kolonie jsou ohroženy jak přirozenými predátory např. liškami, tak i lidmi, kteří sbírají vejce a ničí okolní prostředí výstavbou cest pro těžbu ropy v Bolívii a Chile (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.5 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou DNA sekvence tvořené krátkými repeticemi o velikosti repetitivní jednotky 1-5 nukleotidů, jejichž celková délka se pohybuje od desítek po stovky párů bází (Bennett, 2000). Zane *et al.* (2002) mikrosatelity označují za jednoduché repetitivní sekvence (*simple sequence repeats*, SSRs) s repetitivním motivem o velikosti jednotky repetic 1-6 párů bází. Chambers *et McAvoy* (2000) je kromě SSRs označují i za krátké tandemové repetic (*short tandem repeats* STRs) nebo také za jednoduché sekvence délkového polymorfismu (*simple sequence length polymorphisms*, SSLPs). Mikrosatelity se podle velikosti repetitivní jednotky dělí na mononukleotidové, dinukleotidové, trinukleotidové, tetranukleotidové, pentanukleotidové a hexanukleotidové, z nichž trinukleotidové jsou nejčastější v exonech všech biologických druhů (Tóth *et al.*, 2000).

Patří mezi ideální genetické markery, protože jsou v euchromatinu hojně rozšířené, jsou vysoce polymorfní a kodominantní. Nacházejí se u prokaryot i eukaryot, u člověka jsou roztroušeny po celém genomu (Bennett, 2000) v kódujících i nekódujících sekvencích (Zane *et al.*, 2002). Jejich role u eukaryot je méně známá než u prokaryot, ale předpokládá se, že některé mikrosatelity mohou mít jistý vliv na regulaci genové exprese, což může být výhodou pro celou populaci. Naopak expanze trinukleotidových repetic je v některých případech pro lidský organismus fatální (Bennett, 2000) Příkladem jsou degenerativní onemocnění jako Huntingtonova choroba nebo myotická dystrofie (Tóth *et al.*, 2000). U člověka tedy mohou být užitečné v oblastech genetické analýzy, kde se používají k hledání genů souvisejících s chorobou (Bennett, 2000). Původ délkového polymorfismu u mikrosatelitů je přičítán dvěma mutačním mechanismům. První je sklouznutí DNA polymerázy v průběhu replikace buňky (Zane *et al.*, 2002), druhým je rekombinace (Li *et al.*, 2002).

3.6 Využití mikrosatelitů

Od osmdesátých let s rozvojem PCR reakce se mikrosatelity staly hojně využívanými markery v mnoha oblastech biologického výzkumu (Jarne *et al.*, 1996). Mikrosatelity mohou mít velký počet alel, což je činí výhodnějšími markery pro genetické mapování oproti RFLP markerům, které mají pouze dvě alely (Brown, 2007).

Jsou využívány při studiu velkého počtu biologických druhů, od hub, přes rostliny až po živočichy (Zane *et al.*, 2002). V kriminalistice jsou důležité při identifikaci podezřelých osob, mohou být využity při výzkumu vývoje člověka a vytváření evolučních stromů (Koreth *et al.*, 1996), pro genetické mapování hospodářských zvířat i rostlin (Chambers *et al.*, 2000) a při pozičním klonování (Koreth *et al.*, 1996). V oblasti humánní medicíny jsou studovány ve spojitosti s genetickými chorobami. V populační genetice se využívají pro studium struktury populací (Jarne *et al.*, 1996) a časté je jejich využití i při paternitních sporech (Oliveira *et al.*, 2006).

3.6.1 Využití mikrosatelitů v ornitologických studiích

Mikrosatelity jsou častými molekulárními markery v ornitologii, přestože je jejich frekvence v genomu ptáků nízká (Zane *et al.*, 2002). Během devadesátých let se staly nejpoužívanějšími molekulárními markery v populačně genetických ornitologických studiích, přestože je jejich širší aplikace znemožněna nedostatkem univerzálních PCR primerů, které by byly schopny amplifikovat homologní produkty u většího počtu druhů ptáků. Tento problém řeší *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů mezi příbuznými druhy ptáků. Mikrosatelit izolovaný z DNA donorového druhu ptáka je použit k amplifikaci DNA cílového druhu ptáka, který je donorovému druhu příbuzný. Pozitivní amplifikace daného mikrosatelitového lokusu vykazující polymorfismus u cílového druhu poukazuje na fylogenetickou příbuznost mezi oběma druhy. Pokud *cross-species* PCR amplifikace mezi druhy úspěšná není, lze tyto druhy považovat za fylogeneticky méně příbuzné (Primmer *et al.*, 2005). Prvními primery, které byly využity při *cross-species* PCR amplifikaci, byly primery odvozené z DNA vlaštovky obecné a lejska černohlavého (Primmer *et al.*, 1996). *Cross-species* PCR amplifikaci ovlivňuje pozitivně snížení teploty *annealingu*, což je teplota nasedání primerů při PCR reakci. Snížením této teploty se šance na úspěšnou *cross-species* PCR amplifikaci zvyšuje (Primmer *et al.*, 2005).

3.6.2 Studium polymorfních mikrosatelitů u plameňáků pomocí *cross-species* PCR amplifikace

Analýzou polymorfních mikrosatelitů u plameňáků pomocí *cross-species* PCR amplifikace se jako světově první zabývala bakalářská práce Drobek (2008), která byla vypracována v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Univerzity Palackého v Olomouci pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. Od tohoto roku se studenti zapojení do bakalářských a diplomových prací intenzivně zabývají touto tematikou a hledají nové mikrosatelitové lokusy od příbuzných druhů ptáků, které by mohly být polymorfní u plameňáků a následně využitelné pro populační a paternitní studie.

3.6.2.1 Studium polymorfních mikrosatelitů u plameňáka růžového

Drobek (2008) testoval mikrosatelitové lokusy odvozené z DNA příbuzných druhů plameňáků z řádů brodiví, veslonozí a potápky na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bylo nalezeno 7 polymorfních lokusů, z nichž 2 byly odvozeny z DNA nesyta lesního (*Mycteria americana*), 3 z DNA kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*) a po 1 z DNA kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*) a volavky velké (*Ardea herodias*). Drobek (2010) se kromě genotypizace mikrosatelitů označených za polymorfní v práci Drobek (2008) také zaměřil na další příbuzné druhy plameňáků. Testoval 214 nových markerů odvozených z DNA zástupců řádů brodiví, veslonozí, potápky, vrubozobí, potáplice, dlouhokřídlí a tučňáci. Z těchto testovaných markerů bylo u plameňáka růžového polymorfních dalších 23 mikrosatelitů. 4 z nich byly odvozeny z DNA volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*), 4 z DNA fregatky obecné (*Fregata minor*), 3 z DNA kolpíka malého (*Platalea minor*), 3 z DNA tereje modronohého (*Sula nebouxii*), 2 z DNA ibise čínského (*Nipponia nippon*), 2 z DNA pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a po 1 z DNA alkounka drobného (*Aethia pygmaea*), čápa bílého (*Ciconia ciconia*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*) a tereje červenonohého (*Sula sula*). Jeden lokus odvozený z DNA nesyta lesního, který Drobek (2008) u plameňáka růžového označuje s dalšími šesti lokusy jako polymorfní, byl po genotypizaci provedené na 22 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového vyloučen jako monomorfní. Drobek (2010) také na DNA plameňáka růžového testoval 10 mikrosatelitů odvozených z DNA plameňáka

karibského. Jednalo se o 10 lokusů publikovaných ve dvou dizertačních pracích (Kapil, 2005; Preston, 2005). Pro některé z těchto lokusů zjistil odlišné charakteristiky a poukázal na možné chyby. Z jeho výsledků vyplývá, že lokusy Pr μ 7, Pr μ 8 a Pr μ 9 označené v práci Preston (2005) za samostatné lokusy představují ve skutečnosti jeden lokus, pro který byly navrženy tři různé páry primerů a autorka je brala omylem jako tři nezávislé genetické markery (Drobek, 2010). S těmito osmi lokusy tak celkově Drobek (2010) popisuje 37 nových polymorfních mikrosatelitů u plameňáka růžového.

Manišová (2011) ověřovala 37 mikrosatelitových lokusů odvozených z DNA plameňáka růžového (Geraci *et al.*, 2010) na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového, jehož DNA byla získána ze ZOO Dvůr Králové nad Labem a ze ZOO Liberec. Z těchto 37 mikrosatelitů jich bylo polymorfních 36, lokus PrC12 polymorfismus nevykazoval a procentuální úspěšnost amplifikace byla 97,3 %. Autorka dále testovala 47 párů nových mikrosatelitů, které byly polymorfni u příbuzných řádů a dosud nebyly na plameňáku růžovém testovány. 12 z nich bylo odvozeno z řádu brodiví a 35 z řádu veslonozí. Z řádu brodiví byly polymorfni 2 mikrosatelity odvozené z DNA volavky červenavé (*Egretta rufescens*), z řádu veslonozí byly polymorfni 2 mikrosatelity odvozené z DNA kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*) a 1 mikrosatelit z DNA faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*). Manišová (2011) tak popisuje 41 nových polymorfních mikrosatelitů pro plameňáka růžového.

Drobek (2010) a Manišová (2011) našli celkem pro plameňáka růžového 78 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

3.6.2.2 Studium polymorfních mikrosatelitů u plameňáka karibského

U plameňáka karibského Drobek (2008) našel 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů. 4 byly odvozeny z DNA nesyta lesního, 2 z DNA ibise rudého (*Eudocimus ruber*) a po 1 odvozeném z DNA kormorána velkého, kormorána galapážského, volavky velké a kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*).

Drobek (2010) popisuje 25 nově nalezených lokusů u plameňáka karibského, 4 odvozené z DNA volavky žlutozobé, 4 z DNA fregatky obecné, 3 z DNA ibise čínského, 3 z DNA tereje modronohého, 2 z DNA pelikána bílého, 2 z DNA kolpíka malého, po 1 z DNA alkounka drobného (*Aethia pygmaea*), kormorána ušatého, ibise rudého, potáplice lední (*Gavia immer*), čápa bílého, pelikána severoamerického a tereje červenonohého. 2 mikrosatelity, které označil Drobek (2008) ve své práci společně s dalšími osmi jako polymorfni, byly po genotypizaci na 30 nepříbuzných jedincích

plameňáka karibského označeny za monomorfní (Drobek, 2010). Jednalo se o mikrosatelity odvozené z DNA kolpíka růžového a nesyta lesního. Celkově je tedy v práci Drobek (2010) popsáno 33 polymorfních mikrosatelitů pro plameňáka karibského odvozených z DNA příbuzných druhů. Drobek (2010) se také zabýval amplifikací a charakterizací lokusů odvozených přímo z DNA plameňáka karibského. Jednalo se o 10 lokusů publikovaných ve dvou dizertačních pracích (Kapil, 2005; Preston, 2005), které testoval i na plameňáku růžovém. Všechny 10 lokusů bylo u plameňáka karibského polymorfních, ale kvůli zmíněné chybě autorky, kterou uvádím v kapitoly 3.6.2.1, je těchto 10 lokusů ve skutečnosti považováno za 8. S těmito osmi lokusy izolovanými z DNA plameňáka karibského je podle Drobka (2010) k dispozici celkem 41 polymorfních lokusů pro plameňáka karibského.

Matošková (2011) se zabývala hledáním dalších polymorfních mikrosatelitů pro plameňáka karibského. Na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského testovala 78 párů primerů, které byly polymorfní u příbuzných druhů z řádů plameňáci, veslonozí a brodiví. Z řádu plameňáci tak bylo testováno 37 lokusů, z řádu veslonozí 29 lokusů a z řádu brodiví 12 lokusů. Polymorfismus u plameňáka karibského vykazovalo z těchto tří řádů celkem 35 lokusů. 31 bylo odvozeno z DNA plameňáka růžového, 2 z DNA faetona žlutozobého a po 1 z DNA kormorána ušatého a volavky červenavé.

Drobek (2010) a Matošková (2011) pro plameňáka karibského celkem našli 76 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Tabulka 2 uvádí řády, zdrojové druhy a počty polymorfních mikrosatelitů u plameňáka karibského, izolovaných ze zdrojových druhů ptáků.

Tabulka 2: Přehled celkového počtu 76 polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka karibského nalezených od zdrojových druhů zařazených do řádů (Drobek, 2008; Drobek, 2010; Matošková, 2011).

Řád	Zdrojový druh	Počet lokusů
Brodiví (Ciconiiformes)	Čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)	1
	Ibis čínský (<i>Nipponia nippon</i>)	3
	Ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	3
	Kolpík malý (<i>Platalea minor</i>)	2
	Nesyt lesní (<i>Mycteria americana</i>)	3
	Volavka červenavá (<i>Egretta rufescens</i>)	1
	Volavka velká (<i>Ardea herodias</i>)	1
	Volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)	4
Dlouhokřídlí (Charadriiformes)	Alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	1
Potáplice (Gaviiformes)	Potáplice lední (<i>Gavia immer</i>)	1
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák karibský (<i>Phoenicopus ruber</i>)	8
	Plameňák růžový (<i>Phoenicopus roseus</i>)	31
Veslonoží (Pelecaniformes)	Faeton žlutozobý (<i>Phaethon lepturus</i>)	2
	Fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	4
	Kormorán galapážský (<i>Phalacrocorax harrisi</i>)	1
	Kormorán ušatý (<i>Phalacrocorax auritus</i>)	2
	Kormorán velký (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	1
	Pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	2
	Pelikán severoamerický (<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>)	1
	Terej červenonohý (<i>Sula sula</i>)	1
	Terej modronohý (<i>Sula nebouxi</i>)	3

3.6.3 Analýza a charakteristika mikrosatelitů u plameňáků *de novo*

Autoři článku Kapil *et al.* (2010), který je dostupný pouze ve formě *preprintu*, popisují 9 polymorfních mikrosatelitových lokusů získaných z parciální genomické knihovny plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). DNA byla izolována pomocí chloroformové extrakce ze vzorků krve 60 jedinců plameňáka karibského žijících v kolonii na poloostrově Yucatan v Mexiku. Vyizolovaná DNA byla použita pro vytvoření parciální mikrosatelitové knihovny. DNA byla následně naštípána enzymem *Tsp* 509I a fragmenty byly elektroforeticky separovány. Poté byly k vybraným fragmentům o velikosti 400-1000 bp přidány *linkery*, které obsahovaly vazebné místo důležité pro PCR amplifikaci. Pomocí T4 DNA ligázy byly připojeny k fragmentům DNA. Konstrukty DNA s napojenými *linkery* byly podrobeny polymerázové řetězové reakci, která obsahovala kromě hlavních komponentů *Taq* DNA polymerázy, hořčičných iontů, příslušného pufru, deoxyribonukleosidtrifosfátů a vody také *forward linker* jako amplifikační primer. Po PCR amplifikaci byly PCR produkty denaturovány a inkubovány s magnetickými kuličkami - oligonukleotidy biotinylovanými na 5' konci, které se na mikrosatelity navázaly. Takto obohacená DNA o mikrosatelitové lokusy byla následně amplifikována pomocí PCR reakce, poté naštípána enzymem *Tsp* 509I, ligována do vektoru a transformována do kompetentních buněk bakterie *Escherichia coli*. Kolonie byly přeneseny na speciální membrány, které byly hybridizovány speciálními sondami navrženými pro různé mikrosatelitové sekvence. Autoradiografie byla provedena pomocí vysokorychlostního autoradiografického filmu a pomocí izolačního protokolu byly získány pozitivní klony. Následně byla osekvenována plazmidová DNA se standardními primery pro plazmid. Po získání sekvencí klonů obsahujících mikrosatelity byly programem PRIMER3 navrženy primery ke každému mikrosatelitu. Nakonec byla provedena PCR s použitím takto navržených primerů a PCR produkty byly separovány v nedenaturujícím polyakramidovém gelu a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. Takto bylo podle Kapil *et al.* (2010) získáno 9 polymorfních lokusů pro plameňáka karibského. 7 těchto lokusů se skládá z uniformních trinukleotidových repetice, zbylé 2 lokusy jsou složeny ze dvou repetice jiného nukleotidového složení. Všechny lokusy se podle autorů nacházely v Hardy-Weinbergově rovnováze a analýza vazebné nerovnováhy neprokázala vazbu u žádného z párů lokusů. Drobek (2010) uvádí, že výsledky dizertační práce Preston (2005) zaznamenané v *preprintu* (Kapil *et al.*, 2010) jsou

nepřesné a z části chybné. Preston (2005) chybně popsala tři jednotlivé lokusy, které ve skutečnosti představovaly jeden a tentýž lokus s jinak navrženými primery. Tvrzení autorů, že tyto lokusy nejsou ve vazbě, je proto chybné (Drobek, 2010). Dále jeden z lokusů obsahoval podle Drobka (2010) velký počet nulových alel, jejichž distribuce se lišila od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 1 %. Tvrzení autorů (Kapil *et al.*, 2010), že se všechny lokusy nacházely v Hardy-Weinbergově rovnováze, je také chybné (Drobek, 2010).

Studiem mikrosatelitů u plameňáků se nezávisle na výzkumech prováděných v Laboratoři populační genetiky zabýval tým vědců z Francie, který izoloval 37 polymorfních lokusů z DNA plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) metodou *de novo*. Výsledky publikovali Geraci *et al.* (2010). Autoři hledali molekulární mikrosatelitové markery za účelem studia populační struktury plameňáků, genetické diverzity populace a genového toku. Cílem jejich laboratorní práce bylo zkonstruovat 4 parciální genomické knihovny pro mikrosatelitové sekvence. Z krve 10 mlád'at jedné hnízdící kolonie ve Francii byla fenol-chloroformovou metodou vyizolována vysokomolekulární DNA, která byla částečně štěpena směsí sedmi restričních enzymů na fragmenty s tupými konci. Tyto fragmenty byly následně připojeny k adaptorům, které obsahovaly na 5'konci restriční místo pro endonukleázu *HindIII*. K těmto fragmentům byly přidány magnetické kuličky s biotinylovaným mikrosatelitovým oligonukleotidem na 5'konci, který měl fragmenty vychytat. Fragmenty obohacené o mikrosatelity byly následně amplifikovány pomocí PCR za použití primerů komplementárních k adaptorům. Po amplifikaci byly adaptory pomocí *HindIII* z PCR produktu odstraněny a produkt mohl být ligací vložen do plazmidů pUC19, které byly poté za pomoci elektroporace vloženy do kmene DH5 α bakterie *Escherichia coli*. Modrobílou selekcí byly vybrány rekombinantní klony a podrobeny náhodnému sekvenování. Nakonec mikrosatelity obsahovalo 86,17 % pozitivních klonů. Pro 60 mikrosatelitů byly navrženy primery programem Designer PCR a syntetizovány. Navržené primery byly na 5'konci fluorescenčně označeny, podrobeny PCR reakci a elektroforetické separaci v agarózovém gelu. Pozitivní produkty byly poté separovány na automatickém sekvenátoru, kdy vhodný výsledek poskytovalo 37 párů primerů použitelných pro další populační studie (Geraci *et al.*, 2010).

3.6.4 *De novo* izolace a *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů u druhů z řádu brodivých

Ptáci z řádu brodiví jsou plameňákům velice příbuzní. Podle Gaislera (1983) někteří autoři dokonce plameňáky do brodivých dříve zařazovali, nebo je měli v úmyslu zařadit do podřádu řádu brodiví (del Hoyo *et al.*, 1992). Podle zjištění Drobka (2010) jsou mikrosatelity odvozené z DNA druhů z řádu brodiví velmi úspěšné při *cross-species* PCR amplifikaci u obou testovaných druhů plameňáků. U plameňáka růžového byla úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace testovaných mikrosatelitů odvozených z DNA druhů z řádu brodiví 8,75% a u plameňáka karibského 12,40%. Z tohoto důvodu jsou primery odvozené z DNA druhů z řádu brodiví jedny z nejdůležitějších pro *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáků, protože se od nich očekává polymorfní produkt. Z tohoto důvodu se má diplomová práce také zabývat nově nalezenými mikrosatelitovými lokusy, které byly *de novo* odvozeny od volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*) (Campanini *et al.*, 2012) a čápa východního (*Ciconia boyciana*) (Wang *et al.*, 2011). Přehled těchto nově izolovaných mikrosatelitů je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 3: Mikrosatelitové lokusy odvozené z DNA volavky rusohlavé a čápa východního. Sloupce tabulky uvádějí: řád; zdrojový druh, ze kterého byl mikrosatelitový lokus izolován; název mikrosatelitového lokusu; autora a rok publikace.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Autor, rok publikace
Brodiví (Ciconiiformes)	Volavka rusohlavá (<i>Bubulcus ibis</i>)	Bi01, Bi08, Bi13, Bi15, Bi18, Bi20, Bi22, Bi26, Bi28, Bi29, Bi30	Campanini <i>et al.</i> , 2012
	Čáp východní (<i>Ciconia boyciana</i>)	Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168, Cbo235	Wang <i>et al.</i> , 2011

3.6.4.1 *De novo* izolace a *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů u volavky rusohlavé

Campanini *et al.* (2012) *de novo* izolovali 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených z DNA volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*). Pro práci použili DNA ze dvou jedinců volavky rusohlavé z Brazílie použitím fenol-chloroformové izolace. Byly vytvořeny dvě parciální genomické knihovny obohacené biotinylovanými sondami. Fragmenty, které s biotinylovanými sondami hybridizovaly, byly vychytány na streptavidinové paramagnetické kuličky. Následně byla provedena PCR s primery komplementárními k sondám. Všechny rekombinantní klony byly osekvenovány. Mikrosatelity byly získány pomocí CID softwaru a primery navrhnuté programem Gene Runner 3.05.

Charakterizace mikrosatelitů byla provedena pomocí PCR s využitím navržených primerů. Byla využita DNA izolovaná z krve 35 jedinců volavky rusohlavé, žijících v kolonii v jihovýchodní Brazílii. Z 32 testovaných lokusů bylo 11 polymorfních. Lokusy měly od 2 do 4 alel a nacházely se v Hardy-Weinbergově rovnováze. U žádného lokusu nebyly zaznamenány nulové alely. Tyto lokusy byly také testovány pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace na dalších 8 druzích ptáků z čeledi volavkovitých. 7 z nich bylo polymorfních u jiných druhů volavek a byly pro tyto druhy navrženy jako markery pro genetické a populační studie.

Volavka rusohlavá původně pochází z Afriky a Asie a v Americe je invazivním druhem. Tyto nově získané markery mohou tak sloužit ke studiu její populační struktury. Vysoký amplifikační úspěch u příbuzných druhů volavek poukazuje na možnou využitelnost markerů pomocí *cross-species* PCR amplifikace i u jiných druhů ptáků (Campanini *et al.*, 2012).

3.6.4.2 *De novo* izolace a *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů u čápa východního

Wang *et al.* (2011) *de novo* izolovali 8 polymorfních mikrosatelitů u čápa východního (*Ciconia boyciana*). Tento druh čápa patří mezi ohrožené druhy. Žije na severu Číny a jihovýchodě Ruska a jeho počty rok od roku klesají. V roce 2001 byly jeho počty odhadovány pouze na 3 000 jedinců. Huang *et Zhou* (2011) pokles populace přisuzují hlavně znečištěnému prostředí a lovu. Je proto důležité znát genetickou diverzitu, která napomůže strategii ochrany těchto vzácných ptáků (Wang *et al.*, 2011).

Tato diplomová práce mimo jiné testuje také 8 markerů odvozených *de novo* z DNA čápa východního na DNA plameňáka karibského. Některé z nich byly u plameňáka karibského označeny jako polymorfní a následně podrobeny genotypingu a statistickému vyhodnocení.

Biologický materiál, tkáň nebo krev, byl odebrán z 23 jedinců čápa východního. Byla provedena fenol-chloroformová izolace DNA. DNA jednoho jedince byla naštípána restriční endonukleázou a k fragmentům byly připojeny AFLP adaptory. Následně byly přidány primery komplementární k adaptorům a byla provedena amplifikace. Produkty byly hybridizovány k oligonukleotidům značeným biotinem a vychytány streptavidinovými magnetickými kuličkami. Následně byla opět provedena amplifikace a PCR produkty byly ligací vloženy do vektoru, který byl následně transformován do kompetentních bakteriálních buněk. Modrobílou selekcí byly vybrány bílé klony pro vytvoření mikrosatelitové knihovny. Klony byly skrínovány použitím tří primerů. Produkty byly nanaseny na gelovou elektroforézu, kde pozitivním výsledkem byly dva proužky na gelu, což značilo, že daný klon obsahuje mikrosatelit. Celkem bylo osekvenováno 110 pozitivních klonů, ale primerů pro mikrosatelity bylo navrženo pouze 14 párů pomocí CID softwaru. Z těchto 14 použitelný polymorfní produkt na 23 jedincích dávalo pouze 8 párů primerů (Wang *et al.*, 2011).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

V laboratoři jsem pracovala s DNA vyizolovanou z krve 30 jedinců plameňáka karibského. Vzorky těchto jedinců pocházejí ze Zoologických zahrad Praha a Liberec. Krev odebraná pracovníky ZOO z tarzální žíly byla následně umístěna v lyzačním Queen's pufru. DNA byla z krve získána za pomoci fenol-chloroformové izolace s předpůsobením proteinázou K, která byla provedena vedoucím práce RNDr. Petrem Nádvorníkem, Ph.D.

4.2 PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů

Složení PCR reakční směsi pro 30 vzorků:

Deionizovaná voda	209,5 µl
Reaction Buffer A 10x	31,5 µl
Roztok MgCl ₂ (25 nmol/l)	18,75 µl
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	3,25 µl
Primer F (10 µmol/l)	15,5 µl
Primer R (10 µmol/l)	15,5 µl
<i>aTaq</i> DNA polymeráza 5U/µl	5 µl

Všechny výše uvedené složky PCR reakční směsi jsem napipetovala do 1,5ml mikrozkušavky, tu jsem zvortexovala a zcentrifugovala. Do 30 PCR mikrozkušavek jsem napipetovala po 1 mikrolitru roztoku DNA o koncentraci 10-20 ng/µl od každého jedince a následně jsem do všech přidala 9 mikrolitrů reakční směsi. Zkušavky jsem uzavřela víčkem, zvortexovala, zcentrifugovala a nakonec vložila do termocykléru, jehož časový a teplotní profil je znázorněn na následujícím schématu.

35 cyklů	}	94 °C	5 minut
		94 °C	30 s
		50 °C	30 s
		72 °C	30 s
		72 °C	7 minut
		10 °C	neomezeně

4.3 Zpracování PCR produktů

Tento postup je optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

1. Malé sklo jsem kartáčem s pomocí saponátu vydrhla pod tekoucí vodou, opláchla deionizovanou vodou a osušila papírovým ubrouskem. Plochu, která se bude dotýkat gelu, jsem dvakrát ošetřila ethanolem a poté na ni nanasla molekulární lepidlo, tj. roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Po pěti minutách jsem plochu čtyřikrát ošetřila ethanolem.
2. Velké sklo jsem omyla z obou stran deionizovanou vodou, vydrhla ho kartáčem a osušila. Plochu, které se bude dotýkat gel, jsem ošetřila ethanolem a nanasla na ni přípravek pro odpuzování vody ze skel. Po pěti minutách jsem plochu opláchla deionizovanou vodou ze stříčky, osušila ji a umístila na ni po stranách dva spacers. Malé sklo jsem ošetřenou stranou dolů položila na velké sklo a obě k sobě připevnila pomocí klipsů.
3. V kádince jsem si připravila 60 ml 6% polyakrylamidového gelu. Roztok jsem promíchala a začala jej opatrně nalévat mezi skla, dokud se celý prostor mezi nimi nevyplnil.
4. V místě, kde jsem nalévala gel, jsem vložila hřebínek rovnou stranou asi 0,7 cm hluboko, aby po zaschnutí gelu vznikla rovná hrana pro pozdější aplikaci hřebínku. V místě hřebínku jsem skla sepnula klipsy a gel nechala hodinu tuhnout.
5. Po hodině jsem ze skel sundala klipsy, kartáčem je očistila od zbytků polyakrylamidu, osušila je a vertikálně upevnila do elektroforetické komůrky tak, aby se malé sklo dotýkalo hliníkové desky. Aby neodtékal pufř, utáhla jsem boční uzávěř.
6. Katodový a anodový prostor jsem naplnila 0,5x TBE pufřem, vytáhla hřebínek, volný prostor mezi skly profoukla stříkačkou a nakonec zapojila kabely ke každé elektrodě. Nastavila jsem výkon na 90 W, elektrický proud na 150 mA, napětí na 3000 V a při tomto nastavení jsem nechala sklo půl hodiny nahřívát.
7. Mezitím jsem do zkumavek k PCR produktům přidala 5 μ l nanášecího pufřu. Po půl hodině jsem vypnula zdroj, profoukla prostor mezi skly stříkačkou

- a vložila hřebínek asi 1 mm hluboko do gelu. PCR produkty po předešlé denuraci jsem umístila do ledu a následně je nanasla na gel.
8. Po nanesení jsem opět zapojila elektrody, hodnoty elektrického proudu a napětí jsem neměnila, ale výkon jsem nastavila na 70 W. PCR produkty se tak dělily při stejnosměrném elektrickém proudu. Po uběhnutí doby elektroforetické separace, která se u analýzy mikrosatelitů pohybovala v průměru kolem tří hodin, jsem vypnula zdroj, nechala odtéct pufr a vyjmula skla z komůrky.
 9. Malé sklo jsem nožem oddělila od velkého a umístila ho na třepačku do misky s předem připraveným fix/stop roztokem 10% kyseliny octové, která má za úkol produkty v gelu zafixovat a odstranit zbytky močoviny. Po dvaceti minutách jsem roztok kyseliny octové slila zpátky do Erlenmayerovy baňky a sklo s gelem promyla deionizovanou vodou. Poté jsem ho na třepačce zalila 1% roztokem kyseliny dusičné, aby se odstranilo nespecifické pozadí.
 10. Po pěti minutách jsem roztok kyseliny dusičné vylila do dřezu a sklo opět promyla deionizovanou vodou. Poté jsem sklo zalila roztokem 0,1% dusičnanu stříbrného, do kterého jsem těsně před tím napipetovala 1,2 ml formaldehydu. Gel jsem v tomto roztoku ponechala na třepačce po dobu třiceti minut. Po uplynuté době jsem roztok dusičnanu stříbrného vrátila zpátky do lahve, sklo s gelem krátce opláchla v deionizované vodě a nakonec ho zalila vychlazenou vývojkou. Postupně se začaly objevovat tmavě hnědé proužky PCR produktů. Až byly dostatečně zřetelné, reakci jsem zastavila fix/stop roztokem kyseliny octové.
 11. Po dvou minutách jsem roztok vylila a sklo ponořila na minutu do deionizované vody. Po té jsem sklo dala do sušárny, kde se gel při 80 stupních za 30 minut usušil. Suché sklo bylo vyhodnoceno na negatoskopu a u každého ze třiceti jedinců byl určen genotyp, počet alel v populaci, konečná teplota *annealingu* a čas elektroforetické separace.
 12. Sklo s gelem bylo naskenováno a následně vloženo do roztoku NaOH, kde se gel od skla kompletně odlepil. Sklo tak mohlo být použito znovu.

4.4 Statistické vyhodnocení mikrosatelitů a analýza vazby

U 42 získaných polymorfních mikrosatelitů amplifikovaných na DNA 30 jedinců plameňáka karibského jsem určila alelové konstituce a podrobila je statistickému vyhodnocení v programu Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007). Tento software

spočítal u každého mikrosatelitového lokusu pozorovanou heterozygotnost (H_O), očekávanou heterozygotnost (H_E) a zjistil, zda jsou lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze. Program spočítal i polymorfni informační obsah (PIC), jehož hodnotou je číslo pohybující se od 0 do 1. Čím je toto číslo vyšší, tím je daný mikrosatelit vhodnější pro popsání populačních charakteristik. Program také určil u každého mikrosatelitu pravděpodobnosti chyb v určování rodičovství a frekvenci nulových alel. Pro praxi se dají použít mikrosatelity s frekvencí alel od 5 do 10 %, ale ideální je, když se u mikrosatelitu nevyskytují žádné nulové alely.

Program GenePop (Rousset, 2008) jsem použila pro analýzu vazby mezi všemi charakterizovanými dvojicemi mikrosatelitů označenými za polymorfni v mé diplomové práci a v diplomové práci Aleše Drobka (2010).

4.5 Použité chemikálie

- Akrylamid (Serva)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/ μ l), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Clear Vue, Rain Repellent (Turtle WAX)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400 μ l každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol – 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Chloroform (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová – ledová (Lachema)

- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)
- N, N' - methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N' - tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Proteináza K (Sigma)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.6 Použité roztoky

Zásobní roztok 6% akrylamidu:

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

Zásobní roztok 10x TBE pufro:

- 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
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Roztok 10% peroxodisíranu amonného $(NH_4)_2S_2O_8$:

- 1 g $(NH_4)_2S_2O_8$
- rozpustit v 10 ml deionizované vody

- uchovávat v chladničce

Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:

- 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
- 3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Polyakrylamidový 6% gel:

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

Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

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

Fix/stop roztok:

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

Roztok 1% kyseliny dusičné HNO_3 :

- 800 ml deionizované vody
- 12 ml 65% HNO_3

Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného AgNO_3 :

- 0,8 g AgNO_3
- objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Vývojka:

- 800 ml deionizované vody
- 24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3

- umístit do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než 10 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného Na₂S₂O₃

Roztok hydroxidu sodného NaOH 1 mol/l:

- 40 g hydroxidu sodného
- rozpustit v 800 ml deionizované vody
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Queen's pufr:

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

TE pufr:

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 200 µl zásobního roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustit v 900 ml deionizované vody
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l a zfiltrvat

4.7 Použité laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná Infiniti (Whirlpool)
- Laboratorní váhy MARKS G22, Elektronik (Belengineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiquette 0,5 až 10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl 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 Dry-block DB-2D (Techne)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Scientific)
- Termocyklér XP Thermal Cycler (BIOER technology)
- Termocyklér Gene-Pro (BIOER technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5 Výsledky

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

6 Diskuze

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block containing multiple lines of blacked-out content]

[Redacted text block containing multiple lines of blacked-out content]

Table with 10 columns and 20 rows. The top row is shaded gray. The table contains blacked-out content in several columns, primarily columns 2, 4, 5, 7, and 9.

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]

7 Závěr

Ve své diplomové práci jsem genotypizovala 35 mikrosatelitových lokusů na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, které Matošková (2011) označila ve své práci jako polymorfní. Po genotypizaci jsem jeden z 35 lokusů vyloučila jako monomorfní a druhý jako nehodnotitelný.

Pro plameňáka karibského jsem našla 5 nových polymorfních mikrosatelitových lokusů od dosud netestovaných druhů. 2 z nich pocházely z DNA volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*) a 3 z DNA čápa východního (*Ciconia boyciana*).

Ověřováním mikrosatelitových lokusů označených za polymorfní u plameňáka růžového (*Phoenicopus roseus*) (Drobek, 2010; Manišová, 2011), ale za monomorfní u plameňáka karibského (Drobek, 2010; Matošková, 2011) jsem našla další 4 polymorfní mikrosatelity pro plameňáka karibského. Dva z nich byly odvozeny z DNA plameňáka růžového a po jednom z DNA tereje modronohého (*Sula nebouxii*) a kormorána galapážského (*Phalacrocorax harissi*).

Pro plameňáka karibského jsem tak celkem charakterizovala 42 polymorfních mikrosatelitů, jejichž průměrný počet alel na lokus byl 5,57. Z těchto 42 mikrosatelitů jsem vybrala 5 lokusů, které doporučuji pro paternitní studie. S 41 nalezenými polymorfními mikrosatelity, které uvádí Drobek (2010), je nyní k dispozici pro plameňáka karibského celkem 83 polymorfních mikrosatelitů.

8 Seznam zkratek

AFLP	polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů (<i>amplified fragment length polymorphism</i>)
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
DNA	deoxyribunukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty
H _E	očekávaná heterozygotnost (<i>expected heterozygosity</i>)
H _O	pozorovaná heterozygotnost (<i>observed heterozygosity</i>)
IUCN	mezinárodní unie pro ochranu přírody (<i>international union for conservation of nature</i>)
NS	lokus je v Hardy-Weinbergovy rovnováze (<i>not significant</i>)
ND	odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy nebyla spočítána (<i>not done</i>)
PAA	polyakrylamidový gel (<i>polyacrylamide gel</i>)
PIC	polymorfnní informační obsah (<i>polymorphic information content</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
SSLPs	jednoduché sekvence délkového polymorfismu (<i>simple sequence length polymorphisms</i>)
SSRs	repetice jednoduchých sekvencí (<i>simple sequence repeats</i>)
STRs	krátké tandemové repetice (<i>short tandem repeats</i>)
T _a	teplota nasedání primerů (<i>annealing temperature</i>)
t _e	čas separace PCR produktu v 6% polyakrylamidovém gelu

9 Použitá literatura

- Alderton D (1995): Ptáci. Překlad z anglického originálu. Nakladatelský dům OP, Praha.
- Anonymous (2012): Animal Diversity Web. *Phoenicopterus ruber*. Publikováno online <http://animaldiversity.ummz.umich.edu>, navštíveno 27. 6. 2013.
- Anonymous (2013a): Zařazení v systému. Publikováno online <http://www.biolib.cz>, navštíveno 28. 6. 2013.
- Anonymous (2013b): BirdLife International 2012. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <http://www.iucnredlist.org>. Navštíveno 28. 6. 2013.
- Anonymous (2013c): BirdLife International 2012. *Phoeniconaias minor*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <http://www.iucnredlist.org>, navštíveno 28. 6. 2013.
- Béchet A, Germain C, Sandoz A, Hirons GJM, Green RE, Walmsley JG, Johnson AR (2009): Assessment of the impacts of hydrological fluctuations and salt pans abandonment on Greater flamingos in the Camargue, South of France. *Biodiversity and Conservation*, 18, 1575–1588.
- Bennett P (2000): Demystified Microsatellites. *Molecular Pathology*, 53, 177–183.
- Brown TA (2007): Klonování genů a analýza DNA. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Campanini EB, Sanches A, Hatanaka T, Del Lama SN (2012): Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from cattle egret (*Bubulcus ibis*) and cross-amplification in other Ardeidae species. *Conservation Genetic Resources*, 4, 707-709.
- 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 Genetic Resources*, *Preview-Only*. Doi: 10.1007/s12686-013-9962-0.
- del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.
- Drobek A (2008): Studium paternity u plameňáků (*Phoenicopterus* sp.) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

- Drobek A (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Duffie C, Glenn TC, Hagen C, Parker P (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 625-627.
- Gaisler J (1983): Zoologie obratlovců. Academia, Praha.
- Gaisler J, Zima J (2007): Zoologie obratlovců, 2. přepracované vydání. Academia, Praha.
- Geraci J, Gaillard M, Bechet A, Cezilly F, Wattier RA (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources. Preprint*.
- Geraci J, Béchet A, Cézilly F, Ficheux S, Baccetti N, Samraoui B, Wattier R (2012): Greater flamingo colonies around the Mediterranean form a single interbreeding population and share a common history. *Journal of Avian Biology*, 43, 341-354.
- 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, 1763-1768.
- Hanzák J, Hudec K (1963): Světem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci. Albatros, Praha.
- Hill A, Green MC (2010): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources*, 3, 13-15.
- Huang X, Zhou X, Chen M, Fang W, Chen X (2010): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics*, 11: 1211-1214.
- Huang Y, Zhou L (2011): Screening and application of microsatellite markers for genetic diversity analysis of Oriental White Stork (*Ciconia boyciana*). *Chinese Birds*, 2, 33-38.
- Humeau L, Da Silva D, Guérin F, Jaquemet S, Requier J-B, Le Corre M (2010): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Phaethon lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources. Preprint*.

- Humple DL (2009): Genetic structure and demographic impacts of oil spills in Western and Clark's Grebes. Diploma Thesis. Sonoma State University, U.S.A.
- Chambers K, MacAvoy E (2000): Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126, 455-476.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back.. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 424-429.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099-1106.
- Kapil R (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations. Doctoral Thesis. University of North Texas. Published online <http://www.unt.edu> .
- Kapil R, Sawyer GM, Preston L, Benjamin RC (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*. *Preprint*.
- Koreth J, O'Leary JJ, McGee JO (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis. Review article. *Journal of Pathology*, 178, 239-248.
- Li YCh, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453-2465.
- Manišová B (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). - Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Matošková T (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). - Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Mercer DM, Haig SM, Mullis TD (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources*, 2, 119-121.
- Morgan-Richards M, Trewick SA, Bartosch-Härlid A, Kardailsky O, Phillips MJ, McLenachan PA, Penny D (2008): Bird evolution: testing the Metaves clade with six new mitochondrial genomes. *BMC Evolutionary Biology*, 8.

- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Carneiro Vieira ML (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294-307.
- Preston EL (2005): Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Doctoral Thesis. University of North Texas. Published online <http://www.unt.edu>.
- Primmer CR, Møller AP, Ellegren H (1996): A wide-range survey of *cross-species* microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365-378 .
- Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merilä J (2005): Factors affecting avian *cross-species* microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36, 348-360.
- Rands M (2007): Flamingo threat put on temporary hold. BirdLife International. Publikováno online <http://www.birdlife.org>, navštíveno 26.6.2013.
- Riordan J, Gardner MG, Fitch AJ, Johnston GR (2013): Isolation, via 454 sequencing, and characterisation of microsatellites for *Phalacrocorax fuscescens*, the blackfaced cormorant (Aves: Phalacrocoracidae). *Australian Journal of Zoology* 60, 340-342.
- Rousset F (2008): GENEPOP' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- Svensson L, Grant PJ (2004): Praktická určovací příručka: Ptáci Evropy, severní Afriky a blízkého východu. Nakladatelství Svojtka & Co., Praha.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (1998): Svět zvířat IV. Ptáci (1). Nakladatelství Albatros a.s., Praha.
- 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, 525-528.
- Tomasulo-Seccomandi A, Schable NA, Bryan ALJr, Brisbin ILJr, Del Lama SN, Glenn TC (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 563-566.
- Tóth G, Gáspari Z, Jurka J (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10, 967-981.
- Veselovský Z (2001): Obecná ornitologie. Academia, Praha.

- 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, 606-608.
- Wiedenfeld DA, Jiménez-Uzcátegui GA (2008): Critical problems for bird conservation in the Galápagos Island. *Cotinga*, 29, 22-27.
- Zane L, Bargelloni L, Paternello T (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1-16.

10 Příloha



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

