

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2012**

**Eva Fišerová**

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



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu  
veslonozí a plameňáci u marabu afrického  
(*Leptoptilos crumeniferus*)**

**Bakalářská práce**

**Eva Fišerová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2012**

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

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

V Olomouci dne .....

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a připomínky, poskytnuté materiály, ochotu, čas a trpělivost, kterou mi poskytl při psaní této bakalářské práce. Děkuji také své rodině, která mě v průběhu studia podporovala a svým kolegyním z Laboratoře populační genetiky.

## Souhrn

V teoretické části své bakalářské práce jsem se zabývala popisem řádu brodiví a jeho jednotlivých 5 čeledí. Největší pozornost jsem věnovala čeledi čápovití (*Ciconidae*), kam patří právě marabu africký. Dále jsem stručně popsala všechny dodnes nalezené polymorfní mikrosatelitové lokusy u ptáků z řádu brodiví. V poslední kapitole jsem se věnovala popisu repetitivních sekvencí a to konkrétně mikrosatelitům, jejich dělení, funkcím, nestabilitě, mutacím a hledání nových mikrosatelitových lokusů.

Hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů pro čápa marabu jsem se věnovala v experimentální části. Využila jsem k tomu metodu *cross-species* PCR amplifikace a 187 párů primerů, původně navržených pro jiné druhy z řádů plameňáci (*Phoenicopteriformes*) a veslonozí (*Pelecaniformes*).

Na konci experimentální části jsem našla 26 polymorfních mikrosatelitových lokusů. U nalezených polymorfních mikrosatelitů byla zoptimalizována teplota annealingu a délka elektroforetické separace. Z 26 párů primerů jich 18 bylo odvozeno od druhů z řádu veslonozí a zbylých 8 z řádu plameňáci. Počet alel se pohyboval od 2 do 7.

## **Summary**

In the theoretical part of my bachelor thesis I dealt with the description of the order Ciconiiformes and of its 5 families. I focused on the family Ciconidae, which includes Marabou Stork. I also briefly described all known polymorphic microsatellite loci of the order Ciconiiformes. In the last chapter I described repeat sequences and more specifically microsatellites, their division, features, instability, mutations and the search for new microsatellite loci.

In the experimental part of my bachelor thesis I focused on the search of polymorphic microsatellite loci in Marabou Stork. I applied the method of cross-species PCR amplification, and I tested 187 primer pairs originally designed for the polymorphic microsatellites for birds belonging to orders of the flamingos (Phoenicopteriformes) and the pelicans (Pelecaniformes).

Totally I found 26 of polymorphic microsatellite loci. For these polymorphic microsatellite loci I optimized annealing temperature and a time of electrophoresis separation. Of the 26 pairs of primers 18 of them were derived from species of the order pelicans, and the remaining 8 of the order of flamingos. The number of allele ranged 2 to 7.

# Obsah

1. Úvod.....	7
2. Cíle práce.....	8
3. Literární přehled.....	9
3.1 Řád brodiví.....	9
3.1.1 Čeleď volavkovití.....	11
3.1.2 Čeleď ibisovití.....	11
3.1.3 Čeleď člunozobcovití.....	11
3.1.4 Čeleď kladivoušovití.....	12
3.1.5 Čeleď čápovití.....	12
3.1.6 Mikrosatelity u ptáků řádu brodiví.....	16
3.2 Repetitivní sekvence DNA.....	18
3.2.1 Rozptýlená repetitivní DNA.....	18
3.2.2 Tandemově uspořádaná repetitivní DNA.....	18
3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
3.3.1 Elektroforetická separace PCR produktů.....	23
3.3.2 Problémy při analýze PCR produktů.....	24
4. Materiál a metody.....	26
4.1 Biologický materiál.....	26
4.2 Izolace genomické DNA z ptačí krve pro PCR.....	26
4.3 PCR amplifikace hledaných mikrosatelitových lokusů.....	27
4.4 Zpracování PCR produktů.....	31
4.5 Použité chemikálie.....	33
4.6 Použité roztoky.....	34
4.7 Laboratorní přístroje.....	37
5. Výsledky.....	38
6. Diskuze.....	46
7. Závěr.....	53
8. Seznam použitých zkratk.....	54
9. Použitá literatura.....	55

## 1. Úvod

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice s délkou základní jednotky 1 - 6 nukleotidů, které se vyskytují jak v eukaryotickém tak v prokaryotickém genomu. Díky vysokému polymorfizmu a relativně snadnému získávání, stojí ve středu zájmu genetických studií. V posledních letech se staly jedním z nejpoužívanějších molekulárních markerů pro genetické populační studie. Pro hledání nových mikrosatelitových lokusů se využívá buď jejich izolace *de novo* nebo *cross-species* PCR amplifikace s využitím primerů získaných od jiných druhů.

Ve své bakalářské práci se věnuji hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů u marabu afrického (*Leptoptilos crumeniferus*). K tomu účelu bude použita metoda *cross-species* PCR amplifikace, při níž bude otestováno všech 187 párů primerů na DNA od 6 nepříbuzných jedinců čápa marabu. Tyto primery byly původně navrženy pro 2 druhy z čeledi plameňáci (Phoenicopteriformes) a 10 druhů z čeledi veslonozí (Pelecaniformes).



## 2. Cíle práce

1. Shromáždit dostupné literární zdroje.
2. Vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
3. Otestovat polymorfismus DNA mikrosatelitů z řádu plameňáků a veslonohých na 6 nepříbuzných jedincích marabu afrického pomocí *cross-species* PCR amplifikace.
4. U mikrosatelitů, které se u marabu afrického ukážou jako polymorfní zoptimalizovat teplotu annealingu a délku elektroforetické separace PCR produktů, aby byly co nejlépe hodnotitelné.

### 3. Literární přehled

#### 3.1 Řád brodiví

Řád brodiví zahrnuje celkem 115 druhů v 5 čeledích rozšířených po celém světě kromě polárních oblastí. U nás je zjištěno hnízdění 10 druhů, které spadají do dvou čeledí, ale běžně v ČR hnízdí pouze 4 druhy (Šťastný *et al.*, 1998).

Taxonomické rozdělení řádu brodiví do 5 čeledí podle Hudce a Černého, 1994.

Řád: Ciconiiformes (brodiví)

Čeď: Ardeidae (volavkovití)

Čeď: Scopidae (kladivoušovití)

Čeď: Balaenicipitidae (člunozobcovití)

Čeď: Threskiornithidae (ibisovití)

Čeď: Ciconiidae (čápvití)

Do řádu brodiví patří střední až velké druhy ptáků, které jsou si značně podobné. Charakteristickým znakem většiny z nich jsou dlouhé nohy, dlouhý krk a silný zobák. Většinou jde o adaptace k lovu nebo sbírání potravy při brodění v mělké vodě (Šťastný *et al.*, 1998). Mají třídílný žaludek, nemají volec a u samců je často přítomen rudimentální penis. Mnohé druhy jsou přizpůsobeny k tzv. statickému plachtění, při němž využívají vzestupné vzdušné proudy nad pevninou (Gaisler, 1994). Zvláštní kloubní úprava 6. obratle umožňuje esovitě prohnutí krku, což je důležité funkční přizpůsobení pro harpunování kořisti (Hudec *et al.*, 1972).

Velké druhy řádu brodiví mají tuhé přiléhající obrysové peří, kdežto u malých druhů je peří měkké (Hudec *et al.*, 1972). V opeření se často vyskytují holá kožovitá místa nebo i různé výrůstky, častá jsou i prodloužená ozdobná pera, zvláště v oblasti

týlu. Zbarvení obou pohlaví je zpravidla stejné nebo jen málo odlišné. Samice bývají menší s méně výraznými ozdobnými pery (Šťastný *et al.*, 1998).

Všichni brodiví jsou masožraví ptáci, živící se převážně vodními živočichy, od larev hmyzu po ryby až 1,4 kg těžké. Pro vyhledání potravy se rozletují v širokém okruhu kolem hnízdních kolonií většinou do 20 km, ale někdy až do 60 km (Šťastný *et al.*, 1998). Přestože loví samotářsky, většina druhů hnízdí ve skupinách. Hnízda zakládají na stromech nebo v mangrovových porostech (Burnie *et al.*, 2008). Vejce jsou skoro u všech druhů bílá, neskvřitá. Krmivá mláďata se líhnou vidoucí a vyznačují se rychlým růstem (Hudec *et al.*, 1972). Potravu si vytahují ze zobáku rodičů a plně vzletná jsou obvykle od jednoho měsíce. Pohlavní dospělosti dosahují mezi 1. - 5. rokem života (Šťastný *et al.*, 1998).

Velmi typická je zvuková kulisa na hnízdní kolonii (Šťastný *et al.*, 1998). Hlasové ústrojí je u brodivých většinou v různé míře zakrnělé, postrádá často hlasových svalů, proto zejména mnozí čápovití nedostatek hlasu nahrazují vydáváním různých zvuků například klapání zobáku. Nejvýraznější hlasové projevy mají volavkovití (Hudec *et al.*, 1972).

Brodiví jsou obyvateli vnitrozemních vod, někteří ibisi a marabuové však žijí převážně v suchém prostředí. Jsou rozšířeni v obou mírných pásích i v teplém pásmu všech světadílů; převaha druhů obývá pásmo tropů. Člunozobcovití a kladivoušovití mají čistě tropické rozšíření (Hudec *et al.*, 1972). V mírném pásmu zahnízdují zjara, zatímco v tropech po celý rok, zpravidla v závislosti na době dešťů (Šťastný *et al.*, 1998).

Velký počet zástupců toho řádu se ocitá na seznamu kriticky ohrožených druhů. Jen někteří se dokázali přizpůsobit změnám, které v krajině způsobil člověk. Například volavka rusohlavá (*Bubulcus ibis*) má prospěch z rozšíření rýžových polí, na kterých našla nová loviště (Burnie *et al.*, 2008).

### 3.1.1 Čeleď volavkovití

Je to nejpočetnější čeleď brodivých, zahrnující velké a středně velké ptáky štíhlého vzhledu (Hudec *et al.*, 1972). Mají klínovitý zobák, díky kterému se kořisti zmocňují tzv. harpunováním. Létají s esovitě zahnutým krkem (Gaisler, 1994). U některých rodů se vyskytují chocholky, u jiných ve svatebním šatě ozdobná pera na různých místech těla (Hudec *et al.*, 1972). Typickým prostředím volavkovitých jsou mělké vody včetně mořského pobřeží a mangrovů. Mají často svérázné hlasové projevy, doprovázející většinou agresivní chování, tok nebo život v hnízdicí kolonii. Průběh toku bývá složitý, samec na hnízdě k sobě zpravidla láká samici různými postoji nebo hlasem (Šťastný *et al.*, 1998). U nás je zjištěno hnízdění 7 druhů (Gaisler, 1994).

### 3.1.2 Čeleď ibisovití

Jsou to středně velcí až velcí ptáci, kteří se dělí do dvou podčeledí. Podčeleď ibisovití zahrnuje ptáky s úzkým zobákem na konci mírně zahnutým. Ptáci, kteří mají zobák na konci lopatovitě rozšířený, se řadí do podčeledi kolpíci. Tito ptáci létají s nataženým krkem (Gaisler, 1994). Tělo je většinou hustě opeřené, někdy na hlavě a kostrči mají značně prodloužená pera (Hudec *et al.*, 1972). Žijí převážně v bažinatém prostředí, jen některé druhy využívají suchá bezlesá území. Potravou ve vodním prostředí jsou především korýši, měkkýši, vodní hmyz, malé ryby a žáby, na suché zemi pak větší hmyz a jiní bezobratlí. Hnízdí většinou v koloniích, hnízda bývají uvnitř bažinných porostů, někdy na stromech nebo skalách a o mláďata pečují oba rodiče (Šťastný *et al.*, 1998).

### 3.1.3 Čeleď člunozobcovití

Obsahuje jediný rod s jediným druhem. Systematické zařazení čeledi je dosti nejasné. V některých znacích se na první pohled podobají volavkám a v jiných čápům. (Šťastný *et al.*, 1998).

Nejnápadnějším znakem člunozobcovitých, jak už název napovídá, je obrovský, baňatý zobák, který ho spolu s imponující postavou, řadí mezi nejvýraznější ptáky afrických močálů (del Hoyo *et al.*, 1992). Velký zobák je pravděpodobně adaptací k lovu kořisti v husté spleti vegetace, v níž se kořist zdržuje (Šťastný *et al.*, 1998). Jejich potravou jsou především vodní hadi, žáby, ještěrky, mladé želvy, ale také vodní ptáci, mladí krokodýli a samozřejmě různé druhy ryb (del Hoyo *et al.*, 1992).

### 3.1.4 Čeleď kladivoušovití

Zahrnuje jen jediný rod s jedním poměrně velkým druhem svérázného vzhledu. Název čeledi je odvozen od tvaru hlavy, která připomíná kladivo. Kladivovitý vzhled umocňuje výrazná chocholka (Šťastný *et al.*, 1998). Kladivoušovití patří mezi typické ptáky, kteří obývají tropickou Afriku a lze je nalézt téměř ve všech typech afrických mokřadů. Živí se převážně žábami, malými rybami, červy, hmyzem a také malými savci (del Hoyo, *et al.*, 1992).

Chování druhu je v mnoha ohledech velmi odlišné od všech blíže příbuzných skupin. Dosud nepochopeným a nevysvětlitelným jevem je vyhoupnutí jednoho jedince na záda druhého. Může se jednat o samce, samici, ale také o ptáka z jiného páru (Šťastný *et al.*, 1998). Není to nijak spojeno s kopulací a děje se tak v jakýkoliv čas během roku (del Hoyo *et al.*, 1992).

### 3.1.5 Čeleď čápovití

Čeleď čápovití je velmi dobře definovaná skupina, jejíž historie sahá do počátku třetihor, konkrétně do svrchního eocénu. Dělí se do třech tribů: Mycteriini, Ciconiini a Leptoptilini. Tribus Mycteriini, neboli „lesní čápi a zejozobi“, zahrnuje 2 rody *Mycteria* (nesyt) a *Anastomus* (zejozeb). Tribus Ciconiini, jinými slovy „typičtí čápi“, zahrnuje 7 druhů rodu *Ciconia* a tribus Leptoptilini, neboli „obrovští čápi“, zahrnuje 3 rody *Jabiru* (jabiru), *Leptoptilos* (marabu) a *Ephippiorhynchus* (čáp) (del Hoyo *et al.*, 1992).

Čápoovití jsou velcí ptáci s dlouhým zobákem, krkem a nohama, u nichž jsou prsty spojeny kůží (Šťastný *et al.*, 1998). Dlouhé nohy jsou více než do poloviny holeně neopeřené a mají poměrně slabě vyvinutý palec naopak ocas je docela krátký (Hudec *et al.*, 1972; del Hoyo *et al.*, 1992). Všichni čápoovití plachtí vynikajícím způsobem, často ve velkých výškách, hlavně díky dlouhým a širokým křídům. Zbarvení peří je u většiny druhů velmi podobné, nejčastěji se střídá kombinace černé a bílé barvy (Šťastný *et al.*, 1998).

Je známo 19 druhů v pěti rodech, které žijí převážně v tropických oblastech (Šťastný *et al.*, 1998). Pouze tři druhy zůstávají přes zimu na svém místě, ostatní čápoovití opouštějí svá hnízdiště a odlétají do tropických částí Asie a Afriky. Čápi jsou poměrně přizpůsobiví, co se týče prostředí. Většina druhů dává přednost mokřadům a okolí vodních ploch, ale jsou schopni žít i v oblastech, kde je voda poměrně vzácná (del Hoyo *et al.*, 1992).

Mezi čápoovitými je velká variabilita ve způsobu získávání potravy a také druhu potravy, kterou se živí. Nejčastěji se živí rybami, obojživelníky, plazy, hmyzem ale také menšími ptáky, krysami a zdechlinami (del Hoyo *et al.*, 1992). Potravu většinou získávají při chůzi v mělké vodě nebo na suchu (Šťastný *et al.*, 1998).

Čápoovití hnízdí na stromech nebo na vyvýšených místech (Šťastný *et al.*, 1998). Staví si dostatečně velká hnízda, která jsou převážně z rostlinného materiálu. Některé druhy spolu vytvářejí páry na celý život (del Hoyo *et al.*, 1992). Tvorba páru se stvrzuje různými postoji, syčivými zvuky a klapáním zobáku (Šťastný *et al.*, 1998). Obvykle kladou 3 až 5 vajec. Největší počet snesených vajec byl zaznamenán v Evropě u čápa bílého, který jich nakladl 7. Vejce jsou křídově bílá, oválného tvaru a jejich hmotnost se pohybuje od 58 do 146 g. Mláďata jsou nidikolní a pečují o ně oba rodiče (del Hoyo *et al.*, 1992).

### 3.1.5.1 Marabu africký

Taxonomické zařazení marabu afrického (Muckley, 2001):

Říše: Živočichové (Animalia)

Kmen: Strunatci (Chordata)

Podkmen: Obratlovci (Vertebrata)

Třída: Ptáci (Aves)

Podtřída: Létaví (Neognathae)

Řád: Brodiví (Ciconiiformes)

Čeleď: Čápovití (Ciconiidae)

Rod: Marabu (*Leptoptilos*)

Druh: Marabu africký (*Leptoptilos crumeniferus*)

Marabu africký obývá tropickou Afriku od Senegalu po Somálsko a na jih po Botswanu (Brown *et al.*, 1993). V jižní Africe se vyskytuje jen vzácně (Šťastný *et al.*, 1998).

Svým vzhledem je nezaměnitelný od ostatních ptáků. Je to velký, robustní pták s holým krkem a hlavou, nepříliš působivého vzhledu. Dorůstá do výšky až 1,5 m a největší jedinci mohou mít 9 kg. Je to jediný zástupce rodu s tmavou duhovkou (Brown *et al.*, 1993; del Hoyo *et al.*, 1992). Rozpětí jeho křídel je skoro 3 m a tím se řadí mezi jedny z největších pozemních ptáků. Elegantní způsob letu kontrastuje s nemotorným vzhledem (Burnie *et al.*, 2008). Dále se vyznačuje kožovitým růžovým vakem na voleti, který má patrně úlohu při namlouvání (Šťastný *et al.*, 1998). Na rozdíl od jiných čápovitých dokáže zatáhnout krk a skrýt ho pod peří. Je to obvykle tichý pták, ale pokud cítí nebezpečí, klape zobákem. Naopak na hníždě vydává různé zvuky od pískání až po vrčení (Brown *et al.*, 1993).

Marabu africký je společenský pták. Vyskytuje se na otevřených savanách, pastvinách, v mokřadech, na březích řek a jezer, jen vzácně v lesích a pouštích (del Hoyo *et al.*, 1992). Často se objevuje v okolí rybářských vesnic, skládek a jatek. Mnoho hodin tráví klidným stáním občas s krátkou procházkou (Brown *et al.*, 1993). Marabu

je sice čáp, ale často se chová jako sup (Burnie *et al.*, 2008). Do jeho jídelníčku se dá zařadit cokoli od termitů až po mrtvého slona. Ale nejčastěji se živí rybami, ještěrkami, hady, krysami a mrtvými zvířaty. Marabu se nechová jako typický mrchožravý pták, který musí být i aktivní predátor. Díky tomu, že obývá právě skládky, jatka a okolí lidských obydlí, kde se nacházejí zbytky jídla a mrtvá zvířata, nemá o potravu nouzi (Brown *et al.*, 1993). Vzhledem k takovému způsobu života se jeho počty neustále zvyšují (Burnie *et al.*, 2008). Pokud se dostane k velké zdechlině, čeká na supy, kteří si potravu trhají, a sbírá kousky, které jim odpadnou od zobáku. Chová se tak, protože nemá zobák přizpůsobený k trhání potravy jako ostatní mrchožraví ptáci (del Hoyo *et al.*, 1992).

**Obrázek 1:** Marabu africký.



Foto: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Marabu hnízdí v koloniích, které tvoří minimálně od 20 - 60 párů až po několik tisíc, často společně s jinými druhy z řádu brodiví (del Hoyo *et al.*, 1992). Hnízdí obvykle v korunách stromů, někdy ve městech a vesnicích a také na útesech



a to zejména v Tanzánii a Súdánu (Brown *et al.*, 1993). Hnízdo obvykle staví 1 m široké a až 30 cm hluboké, olemované větvičkami a listím. Běžně snáší 3 - 4 vejce, jejichž inkubace trvá 29 - 31 dní. Mláďata dosahují pohlavní dospělosti dovršením 4 let. Marabu se dožívá poměrně vysokého věku. Ve volné přírodě kolem 25 let, ale v zajetí jsou známé případy, kdy se dožívají až 41 let (del Hoyo *et al.*, 1992). Marabu africký nepatří mezi světové ohrožené druhy (del Hoyo *et al.*, 1992).

### 3.1.6 Mikrosatelity u ptáků řádu brodiví

Jak už je popsáno výše, řád brodiví zahrnuje 5 čeledí: volavkovité, čápoité, ibisovité, člunozobcovité a kladivoušovité, ale polymorfní mikrosatelity byly popsány pouze u některých druhů z prvních tří jmenovaných čeledí. Většina autorů prací navrhuje primery pro mikrosatelitové lokusy *de novo*, jen někteří hledají polymorfní mikrosatelity pomocí *cross-species* PCR amplifikace.

Z čeledi volavkovití byly poprvé hledány mikrosatelity a syntetizovány primery *de novo* u druhu volavka velká (*Ardea herodias*). Autoři navrhli primery pro 17 lokusů, kdy 15 z nich se projevilo jako polymorfní. Tyto primery také úspěšně využili ke *cross-species* PCR amplifikaci u třech blízkých příbuzných druhů (*A. alba*, *A. cinerea* a *A. cocoi*) (McGuire *et al.*, 2002). Chang *et al.* (2009) detekovali 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů pro kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*). Další nově navržené primery byly pro mikrosatelitové lokusy volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) a volavky červenavé (*Egretta rufescens*). U volavky žlutozobé bylo popsáno 18 polymorfních mikrosatelitů (Huang *et al.*, 2010) a u volavky červenavé 12 (Hill *et al.*, 2011).

*Cross-species* PCR amplifikací se zabývali Chang *et al.*, (2005) u kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*). Pro amplifikace úspěšně použili 8 párů primerů původně nasyntetizovaných pro volavku velkou (*Ardea herodias*).

U čápoitých byly charakterizovány polymorfní mikrosatelitové lokusy u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), čápa východního (*Ciconia boyciana*) a nesyta amerického (*Mycteria americana*). Van den Bussche *et al.*, (1999) jako první charakterizovali ve své práci 4 polymorfní mikrosatelitové lokusy u nesyta amerického. V roce 2003

bylo u něho popsáno dalších 11 polymorfních lokusů (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003). U čápa bílého bylo detekováno 7 polymorfních mikrosatelitů v roce 2009 (Shepard *et al.*, 2009). Dále zkoušeli amplifikovat DNA čápa bílého pomocí *cross-species* PCR s využitím šesti párů primerů od nesyta amerického. Wang *et al.* (2011) popsali 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa východního.

Další polymorfní mikrosatelity u čápa východní charakterizovali Huang *et al.* (2011). Metodou *cross-species* PCR amplifikace s použitím primerů původně navržených pro volavku velkou, čápa bílého a ibise japonského, našli 11 polymorfních lokusů.

Jako první charakterizovali polymorfní mikrosatelitové lokusy u čeledi ibisovití Ji *et al.* (2004) u ibise japonského (*Nipponia nippon*). Autoři popsali 8 polymorfních lokusů u tohoto kriticky ohroženého druhu. Jeho současná populace se vyvinula z posledních 4 volně žijících jedinců objevených v roce 1981 (Ji *et al.*, 2004). O dva roky později bylo publikováno více prací zabývajících se izolací a charakterizací mikrosatelitových lokusů u druhů z čeledi ibisovití. U kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*) charakterizovali 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Sawyer *et al.*, 2006). U dalšího druhu, ibise rudého (*Eudocimus ruber*), bylo popsáno 10 polymorfních lokusů (Santos *et al.*, 2006) a také dalších 11 polymorfních lokusů u ibise japonského (He *et al.*, 2006). Yeung *et al.* (2009) našli 23 polymorfních lokusů u kolpíka malého (*Platalea minor*).

*Cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů s využitím primerů od blízce příbuzných druhů provedli Lei *et al.* (2005). Použili 22 párů primerů, kdy 4 páry byly vhodné pro ibise japonského. Metodu *cross-species* PCR amplifikace využil také Wilson (2008) k amplifikaci DNA ibise posvátného (*Threskiornis aethiopicus*). Využil k tomu primery navržené pro ibise japonského, vlaštovku obecnou (*Hirundo rustica*), lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) a také pro tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*). Výsledkem byly 2 polymorfně amplifikované mikrosatelity.

## 3.2 Repetitivní sekvence DNA

Repetitivní sekvence DNA jsou nukleotidové sekvence, které se v genomu nacházejí v mnoha kopiích, většinou ale nikoliv uvnitř genů (Campbell *et* Reece, 2006). V haploidní sadě chromozomů se mohou opakovat až milionkrát a jsou nezanedbatelnou součástí (10 - 15 %) eukaryotického genomu. Jedním z důvodů nižší hustoty genů ve větších eukaryotických genomech je, že tyto genomy obsahují právě značné množství repetitivní DNA (Snustad *et* Simmons, 2009). Lze ji rozdělit do dvou typů v závislosti na tom, zda jsou jednotlivé repetitivní jednotky rozptýleny nebo seskupeny (Bennett, 2000).

### 3.2.1 Rozptýlená repetitivní DNA

Eukaryotický genom obsahuje obrovské množství rozptýlené repetitivní DNA, která není uložena opakovaně za sebou, ale roztroušena po celém genomu. Jedna repetice je obvykle dlouhá 100 až 1000 párů bází. Úseky jsou si podobné, ale většinou ne vzájemně identické. Tyto repetice se vyskytují převážně u savců a mají charakter pohyblivých genetických elementů - transpozonů (Campbell *et* Reece, 2006). Transponovatelné genetické elementy jsou nejrozšířenějším typem repetitivních sekvencí DNA. Mohou se přemísťovat z jednoho místa na chromozomu na jiné nebo dokonce i na jiný chromozom (Snustad *et* Simmons, 2009). Tyto sekvence se dají rozdělit do dvou velkých skupin. SINEs (short interspersed repeats) krátké rozptýlené repetice a LINEs (long interspersed repeats) dlouhé rozptýlené repetice (Bennett, 2000).

### 3.2.2 Tandemově uspořádaná repetitivní DNA

Tandemově uspořádaná repetitivní DNA se skládá z krátkých sekvencí opakovaných v sériích. Nukleotidové složení tandemově repetitivní DNA je často velmi odlišné od zbylé buněčné DNA. Řada geneticky podmíněných chorob je spojena právě s výskytem tandemových repetit a to nejčastěji tripletů. Mezi takové choroby patří například syndrom fragilního chromozomu X, za který je zodpovědný opakující se triplet CGG. V normální alele pro fragilní X se triplet opakuje asi 30krát zatímco

v alele fragilního X se triplet opakuje 100 - 1000krát a vytváří tak fragilní (křehké) místo. Další takovou chorobou je Huntingtonova chorea, která je spojena s opakováním tripletu CAG (Campbell *et* Reece, 2006). Je více typů tandemové repetitivní DNA a to satelitní, minisatelitní a mikrosatelitní (Bennett, 2000).

### **3.2.2.1 Satelity**

Satelitní DNA byly první objevené repetice s tandemově se opakujícím motivem. Velikost základní repetitivní jednotky satelitní DNA se pohybuje kolem několika stovek bp, nicméně, celková velikost opakování v jednom lokusu je obrovská a může dosahovat až několika Mb. Lidská satelitní DNA není přepisovaná a nachází se v heterochromatinu a to zejména v centromerách (Bennett, 2000).

### **3.2.2.2 Minisatelity**

Na rozdíl od satelitů jsou minisatelity mnohem zajímavější a užitečnější pro genetické studie (Bennett, 2000). Minisatelity jsou obvykle definovány jako tandemově se opakující krátké repetice, jejichž velikost se pohybuje od 0,5 až po několik kb a velikost základního motivu od 6 až po 100 bp (Vergnaud *et* Denoeud, 2000). Mnoho těchto lokusů vykazuje veliký polymorfismus (Ramel, 1997). Mutabilita minisatelitů se pohybuje okolo 0,4 - 5 % mutací za generaci, v případě mikrosatelitů je to 0,1 % mutací za generaci (Flegr, 2009).

Minisatelity se dělí do dvou typů, známých jako telomerická DNA a hypervariabilní minisatelitní DNA. Telomerické minisatelity se skládají z 10 - 15 kb hexanukleotidových repetic. Přidání těchto sekvencí k telomerám všech chromozomů je realizováno enzymem telomeráza (Bennett, 2000). Pro savčí genom jsou typické telomerické sekvence s repetitivní jednotkou dlouhou 5 - 8 bp, kde základním motivem je TTAGGG (Ramel, 1997). Druhý zmíněný typ hypervariabilní minisatelitní DNA se označuje jako VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) (Zima *et al.*, 2004).

### 3.2.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity se jinak nazývají jako repetice jednoduchých sekvencí SSRs (simple sequence repeats) nebo krátké tandemové repetice STRs (short tandem repeats). Zahrnují krátké tandemové repetice od 1 do 6 nukleotidů, které se vyskytují jak v eukaryotickém tak v prokaryotickém genomu (Oliveira *et al.*, 2006). Nacházejí se v proteiny kódujících i nekódujících oblastech genomu (Tóth *et al.*, 2000). Mikrosatelity patří mezi velmi variabilní sekvence DNA. Jejich velká proměnlivost vychází z počtu opakování jednotky repetice ne z primární sekvence (Ellegren, 2004). V posledních letech se mikrosatelity staly jedním z nejpobulárnějších molekulárních markerů. Díky vysokému polymorfizmu a relativně snadnému získávání, stojí ve středu zájmu genetických studií (Zane *et al.*, 2002).

### 3.2.2.4 Dělení mikrosatelitů

Typické dělení mikrosatelitů je na mono-, di-, tri-, a tetranukleotidové, ale repetice o 5 a 6 nukleotidech se také obvykle řadí mezi mikrosatelity (Ellegren, 2004). Nejfrekventovanější jsou dinukleotidové motivy následované tri- a tetranukleotidovými. U savců se nejčastěji nacházejí mikrosatelity se sekvencí  $(AC)_n/(TG)_n$ , která se vyskytuje dvakrát častěji než repetice AT a třikrát častěji než AG (Zima *et al.*, 2004).

Dále mohou být mikrosatelity klasifikovány podle typu opakující se sekvence na dokonalé (*perfect*), nedokonalé (*imperfect*), přerušené (*interrupted*) a složené (*composite*). Dokonalé sekvence nejsou přerušeny žádnou jinou bází, která nepatří k motivu (např. TATATATATATATA), zatímco nedokonalé sekvence obsahují uvnitř bázi, která není shodná s opakujícím se motivem (např. TATATATCTATATA). V případě přerušného mikrosatelitu, se uvnitř opakující se sekvence nachází krátká sekvence, která není shodná s motivem (např. TATATACGTGTATATA), zatímco složená sekvence obsahuje dva opakující se motivy těsně vedle sebe (např. TATATATAGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

### 3.2.2.5 Mutace mikrosatelitů, jejich nestabilita a funkce

Mikrosatelity jsou charakterizovány vysokou mutační rychlostí (u savců včetně člověka řádově  $10^{-3}$  až  $10^{-4}$  na lokus a generaci). Za hlavní zdroj vysoké proměnlivosti mikrosatelitů se považuje sklouznutí nukleotidového řetězce během replikace (*replication slippage*) (Zima *et al.*, 2004). Při tomto jevu dojde nejprve k lokální krátkodobé denaturaci dvouřetězcové molekuly DNA a následně k denaturaci úseků řetězce nikoli s původně protilehlou komplementární oblastí antiparalelního řetězce, ale s jinou, nejčastěji přilehlou oblastí obsahující komplementární báze (Flegr, 2009). Na jejich evoluci se mohou zřejmě podílet i jiné mutační mechanismy. Výsledkem je, že se jednotlivé alely vzájemně liší délkou a mohou být snadno separovány pomocí elektroforézy (Zima *et al.*, 2004).

Mezi jiné mutační mechanismy patří chyby během rekombinace a nerovnoměrný crossing-over (Strand *et al.*, 1993). Nerovnoměrný crossing-over nastává tehdy, jestliže dojde k párování dvou vzájemně komplementárních, ale přitom nehomologických úseků DNA. Může k němu dojít v rámci jedné nebo dvou molekul DNA (Flegr, 2009). Většina těchto primárních mutací je opravena enzymatickým systémem korekce chyb (Ellegren, 2004).

Většina mikrosatelitů je nestabilních, zejména repetice bohaté na CG trinukleotidy a CA dinukleotidy, vykazují velkou míru nestability oproti jiným repeticím. Důvod pro tuto specifickou nestabilitu není prozatím znám (Ramel, 1997).

Někteří autoři nepřikládají mikrosatelitům přílišný význam, jiní naopak považují mikrosatelity za nezbytné například při replikaci DNA (Oliveira *et al.*, 2006).

Mikrosatelity se považují za „horká místa“ pro rekombinaci. Dinukleotidové motivy jsou přednostní místa pro rekombinace z důvodu jejich vysoké afinity k rekombinačním enzymům. Dinukleotidy jako GT, CT a další mají vliv na rekombinace nepřímo skrze jejich vliv na strukturu DNA (Chistiakov *et al.*, 2006).

Další jejich funkcí je vliv na replikaci DNA. Například u potkana je amplifikace DNA ukončena speciální terminační sekvencí. Tato sekvence utváří smyčku, která slouží jako signál k zastavení DNA polymerázy (Chistiakov *et al.*, 2006).

### 3.2.2.7 Hledání nových mikrosatelitových lokusů

Hlavní nevýhodou mikrosatelitů je, že se musí nejprve nalézt a identifikovat vhodné primery pro jejich amplifikaci. Vzhledem k tomu, že většina mikrosatelitů se nachází v nekódujících oblastech genomu, je zpravidla nutné mikrosatelity izolovat *de novo* (Zima *et al.*, 2004). Protože ale vývoj nových mikrosatelitů pro konkrétní druhy je finančně a časově náročný, často se používá *cross-species* PCR amplifikace (Galbusera, 2000).

Pro navržení mikrosatelitů *de novo* se používá několik experimentálních protokolů. Obecně můžeme izolaci shrnout do několika kroků (Zima *et al.*, 2004).

Nejprve je izolovaná DNA rozštěpena jednou nebo více restrikčními endonukleázami a fragmenty jsou separovány pomocí elektroforézy. Fragmenty o velikosti 300 - 700 bp jsou vloženy do plazmidu buď přímo, nebo pomocí adaptorů. Plazmidy jsou následně vloženy do kompetentních buněk a vznikají tak tisíce rekombinantních klonů, které jsou testovány na přítomnost mikrosatelitových sekvencí. Pokud obsahují hledanou sekvenci a mají dostatečně dlouhé ohraničující sekvence, mohou k nim být navrženy primery (Zane *et al.*, 2002; Zima *et al.*, 2006).

U ptactva se *cross-species* amplifikace stala velmi důležitou metodou, jelikož ptačí genom obsahuje až desetkrát méně mikrosatelitů než například lidský (Galbusera, 2000).

Mikrosatelity vykazují velkou míru mutací oproti kódujícím oblastem. U evolučně vzdálenějších druhů nahromaděné mutace obklopující mikrosatelit brání nasednutí primeru a proto musí být primer navržen *de novo*. U blízce příbuzných jedinců lze využít primery pro *cross-species* PCR amplifikaci (Primmer *et al.*, 1996).

Principem této metody je, že se používají primery, které byly původně nasynthetizované pro jiný tzv. zdrojový druh, který je spřízněný se zkoumaným druhem. Úspěšnost amplifikace koreluje s fylogenetickou vzdáleností mezi zdrojovým a zkoumaným druhem (Primmer *et al.*, 1996).

### 3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je velmi jednoduchá a elegantní metoda, která umožňuje amplifikovat *in vitro* požadovaný specifický úsek DNA (Zima *et al.*, 2004).

Reakční směs obsahuje templátovou DNA, DNA-polymerázu, dva oligonukleotidové primery, čtyři typy deoxyribonukleosidtrifosfátů (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) a pufr. Důležitým faktorem je také přítomnost hořčnatých iontů ve formě MgCl<sub>2</sub>, které zajišťují správné fungování polymerázy. Celkový objem doplňuje deionizovaná voda (Koreth *et al.*, 1996).

Základní cyklus polymerázové řetězové reakce sestává ze tří kroků: denaturace, navázání primerů (*annealing*) a extenze (Zima *et al.*, 2004).

V prvním kroku je genomová DNA obsahující sekvence, které mají být amplifikovány, denaturována zahřátím na 92 - 95 °C. Ve druhém kroku je denaturovaná DNA hybridizována s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů tak, že se inkubují společně při 50 - 60 °C. Ideální teplota pro připojení primerů závisí na tom, z kolika a z jakých bází jsou složeny. Ve třetím kroku je použita DNA-polymeráza pro replikaci úseku mezi místy komplementárními k primerům. K polymeraci obvykle dochází při 70 - 72 °C. Délka těchto tří fází se pohybuje v časovém rozmezí od 30 s do 1,5 minuty. V následujícím cyklu se produkty prvního cyklu replikace denaturují a po připojení primerů replikují DNA-polymerázou. Proces se mnohokrát opakuje, dokud není dosaženo požadovaného stupně amplifikace (Snustad *et Simmons*, 2009).

#### 3.3.1 Elektroforetická separace PCR produktů

Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, tudíž se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují ke kladně nabitě elektrodě - anodě (Šmarda *et al.*, 2005).



Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou (Šmarda *et al.*, 2005). Polyakrylamidové gely vznikají katalytickou polymerací dvou monomerů, akrylamidu a N, N'-metylenbisakrylamidu. Gel je tvořen dlouhými vlákny polymerovaného akrylamidu, navzájem spojenými vlákny N, N'-metylenbisakrylamidu. Velikost pórů v gelu se může měnit upravením koncentrace obou složek. Čím je akrylamid koncentrovanější tím jsou póry menší (Zima *et al.*, 2004). Po dokončení elektroforézy je třeba zviditelnit polohu separovaných molekul, protože nejsou pouhým okem viditelné. K vizualizaci se například používá etidiumbromid, fluorescenční barviva nebo dusičnan stříbrný (Šmarda *et al.*, 2005).

### 3.3.2 Problémy při analýze PCR produktů

Analýzu PCR produktů nejčastěji komplikuje přítomnost nulových alel, *stutter* bandů a alelové homoplazie.

Jako nulová alela, se označuje každá alela mikrosatelitního lokusu, která není amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce a následně detekována v gelu (Dakin *et* Avise, 2004). Ke vzniku nulových alel vede více možností. Jednou z nich jsou mutace v oblastech DNA přiléhajících k sekvenci mikrosatelitu (*flanking regions*), kde nasedají primery. Pokud dojde k velkým změnám v přiléhající oblasti, je tak zabráněno nasednutí primeru během PCR reakce a mikrosatelitový lokus není amplifikován. Další možnou příčinou vzniku nulové alely je preferenční amplifikace kratších alel nebo sklouznutí polymerázy během PCR amplifikace (Chapuis *et* Estoup, 2007). Při genovém mapování a určování diagnózy nevede přítomnost segregující nulové alely ke znehodnocení získaných dat, ale může vést ke ztrátě informací. Přítomnost nulové alely může vést také k vyloučení potencionálního otce a k získání zavádějících údajů jako přítomnost vazbové nerovnováhy nebo genetické poruchy (Callen *et al.*, 1993).

Dalším problémem při analýze PCR produktů je výskyt *stutter* bandů známých také jako stínové bandy nebo produkty sklouznutí DNA-polymerázy (Walsh *et al.*, 1996). *Stutter* bandy vznikají během amplifikace a od normálního produktu se liší

délkou. Většinou jsou zkráceny o jednu nebo dvě opakující se jednotky a jejich vznik je zapříčiněn sklouznutím *Taq* DNA-polymerázy při replikace komplementárního řetězce v místě repetice. *Stutter* bandy vznikají nejčastěji u dinukleotidových repeticí v menší míře pak u tri- a tetranukleotidových repeticí (Daniels *et al.*, 1998). Pokud se jedná o dinukleotidové repetice je produkt nejčastěji zkrácen o 2 jednotky oproti normálnímu. Jsou známy i repetice, jejichž produkty byly při amplifikaci zkráceny o 4 až 6 jednotek. Problém při hodnocení výsledků nastává tehdy, když se *stutter* band jedné alely překrývá s hlavním produktem jiné alely (Walsh *et al.*, 1996).

Homoplazie alel je definovaná jako jev, kdy dvě alely mají stejnou velikost nebo sekvenci, ale nejsou odvozeny z jedné ancestrální alely (Jarne *et Lagoda*, 1996). Hlavní příčinou homoplazie alel jsou mutace a je to také způsob jakým dochází ke vzniku nových alel. Alelová homoplazie nepředstavuje příliš velký problém při mnoha analytických metodách populační genetiky, protože je kompenzována vysokou variabilitou mikrosatelitových lokusů (Estoup *et al.*, 2002).

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Genomická DNA, která sloužila jako biologický materiál, byla vyizolována z krve, získané od 6 nepříbuzných jedinců marabu afrického (*Leptoptilos crumeniferus*). Vzorke krve byly odebrány pracovníky Zoologické zahrady ve Dvoře Králové nad Labem a do doby izolace DNA byly uchovány v lednici v Queen's pufu (Seutin *et al.*, 1991).

### 4.2 Izolace genomické DNA z ptačí krve pro PCR

Tento postup byl převzat podle Maniatis *et al.* (1982) a byl upraven pro materiální a technické podmínky Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty UPOL.

1. Do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml bylo napipetováno 400  $\mu$ l roztoku krve v Queen's pufu (Seutin *et al.*, 1991).
2. Do roztoku byla připipetována proteináza K (10 mg/ml) a směs se překlápěním promíchala. Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l 10% roztoku SDS.
3. Mikrozkušavky se inkubovaly v termostatu při 37 °C přes noc do druhého dne.
4. Druhý den bylo ke směsi přidáno 350  $\mu$ l fenolu a 350  $\mu$ l chloroformu a mikrozkušavky byly zvortexovány a centrifugovány (5000 g/2 min). Po centrifugaci byla vrchní fáze odebrána ustříženou špičkou do nové zkušavky, tak aby nedošlo k nasátí vláken DNA se zbytky fenolu a chloroformu.
5. K odebranému roztoku bylo přidáno 700  $\mu$ l chloroformu a mikrozkušavky byly opět zvortexovány a centrifugovány (5000 g/2 min). Po centrifugaci byla vrchní fáze odebrána tak, aby nedošlo k nasátí bílého zákalu proteinů z mezifáze. Tento krok byl ještě jednou zopakován.
6. K odebranému roztoku bylo přidáno 180  $\mu$ l vychlazeného octanu sodného (3 mol/l) a objem se doplnil vychlazeným 96% etanolem. Mikrozkušavky byly překlápěním promíchány a uloženy na 2 hodiny do -20 °C.

7. Po uplynutí této doby byly mikroskopické centrifugovány 30 minut při 13000 g/min.
8. Etanol byl opatrně slit, aby nedošlo k vylití sraženiny DNA a byl přidán 1 ml vychlazeného 70% etanolu.
9. Mikroskopické byly opět centrifugovány tentokrát 10 minut při 13000 g/min.
10. Etanol byl slit, tak aby nedošlo k vylití sraženiny DNA a obsah mikroskopické byl vysušen v termobloku.
11. K vysušené DNA bylo připipetováno 500  $\mu$ l TE pufru.
12. Mikroskopické se umístily přes noc do termostatu při 40 °C a jejich obsah byl překlápním rozpuštěn.
13. Po stanovení koncentrace na nanodropu byl roztok DNA v mikroskopické zmrazen v -20 °C. Část obsahu mikroskopické byla odebrána a zředěna deionizovanou vodou na koncentraci 10-50  $\mu$ g/ml pro PCR a uchována v lednici.

#### 4.3 PCR amplifikace hledaných mikrosatelitových lokusů

PCR amplifikace genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců marabu afrického byla provedena pomocí 187 párů primerů. Jelikož byla použita metoda *cross-species* PCR amplifikace, nebyly tyto primery původně navrženy pro marabu afrického, ale pro jiné druhy. 47 párů primerů bylo původně navrženo pro plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) z řádu plameňáci (Phoenicopteriformes). Zbývajících 140 páru primerů bylo navrženo pro druhy z řádu veslonozí (Pelecaniformes). Konkrétně pro fregatku obecnou (*Fregata minor*), kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), tereje guánového (*Sula variegata*), tereje modronohého (*Sula nebouxii*) a tereje červenonohého (*Sula sula*).

**Tabulka 1:** Přehled testovaných mikrosatelitových lokusů u marabu afrického, v tabulce je dále uveden zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu a autor publikace.

Řád	Zdrojový druh	Testované lokusy	Autor
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopterus ruber</i> )	Prμ 1, Prμ 2, Prμ 3, Prμ 4, Prμ 5, Prμ 6, Prμ 7, Prμ 8, Prμ 9	Kapil <i>et al.</i> , 2010
		Prμ 13	Preston, 2005
	Plameňák růžový ( <i>Phoenicopterus roseus</i> )	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139	Geraci <i>et al.</i> , 2010
Veslonoží (Pelecaniformes)	Fregatka obecná ( <i>Fregata minor</i> )	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18	Deaborn <i>et al.</i> , 2008
	Kormorán galapážský ( <i>Phalacrocorax harrisi</i> )	PhB2, PhB4, PhB11, PhC11, PhD11, PhF12, PhG8, PhG12	Duffie <i>et al.</i> , 2008
	Kormorán chocholatý ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> )	Phaari01, Phaari02, Phaari03, Phaari04, Phaari05, Phaari06, Phaari07, Phaari08, Phaari09, Phaari11, Phaari12, Phaari13, Phaari14, Phaari15, Phaari16, Phaari17	Barlow <i>et al.</i> , 2010
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	Dcco-01, Dcco-02, Dcco- 03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08	Mercer <i>et al.</i> , 2010

**Tabulka 1:** Pokračování.

Řád	Zdrojový druh	Testované lokusy	Autor
Veslonoží (Pelecaniformes)	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	COR 01, COR 03, COR 05, COR 06, COR 07, COR 12, COR 15, COR 17, COR 19, COR 20, COR 21, COR 22, COR 23, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 35, COR 38, COR 40, COR 41, COR 43, COR 45, COR 47	Fike <i>et al.</i> , 2009
	Kormorán velký ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )	PcD2, PcD4, PcD5, PcD6, PcT1, PcT3, PcT4	Piertney <i>et al.</i> , 1998
	Pelikán bílý ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	PEL086, PEL149, PEL175 PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265, PEL304	De Ponte Machado <i>et al.</i> , 2009
	Pelikán severoamerický ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 07, PeEr 08, PeEr 09	Hickman <i>et al.</i> , 2009
	Terej guánový ( <i>Sula variegata</i> )	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A- 47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-95, Sv2A-152, Sv2B- 27, Sv2B-138	Taylor <i>et al.</i> , 2010
	Terej modronohý ( <i>Sula nebouxii</i> )	Boob-RM2-F07, Boob- RM3-D07, Boob-RM3-F11, Boob-RM4-A08, Boob- RM4-B03, Boob-RM4-C03, Boob-RM4-D07, Boob- RM4-E03, Boob-RM4-E10, Boob-RM4-F11, Boob- RM4-G03	Faircloth <i>et al.</i> , 2009
		Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A- 123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B100	Taylor <i>et al.</i> , 2010
Terej červenonohý ( <i>Sula sula</i> )	Ss1b-16, Ss1b-51, Ss1b-57, Ss1b-98, Ss1b-106, Ss1b- 142, Ss2b-2, Ss2b-35, Ss2b- 48, Ss2b-71, Ss2b-88, Ss2b- 92, Ss2b-110, Ss2b-138, Ss2b-153	Morris- Pocock <i>et al.</i> , 2010	

Reakční směs pro PCR byla připravena napipetováním jednotlivých složek uvedených v tabulce 2 do 1,5ml mikrozkušavky.

**Tabulka 2:** Složení PCR mixu pro 6 vzorků.

Složky PCR mixu	Objem (μl)
Deionizovaná voda	44,4
Storage Buffer 10x	6,7
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	4,0
dNTPs (20 μmol/l)	0,7
Primer F (10 μmol/l)	3,3
Primer R (10 μmol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA-polymeráza (5U/μl)	1,0

Všechny chemikálie PCR směsi byly uchovávány v mrazáku při -20 °C. Před napipetováním všech složek do 1,5ml mikrozkušavky, byly jednotlivé mikrozkušavky s chemikáliemi rozmrazeny, zvortexovány a centrifugovány. Složky byly pipetovány v takovém pořadí, jaké je uvedeno v tabulce 2. Takto připravený PCR mix byl rozpipetován do šesti 0,2 ml mikrozkušavek.

Jednotlivé reakce o objemu 10 μl se skládaly z 9 μl PCR mixu a 1 μl genomické DNA čápa marabu o koncentraci 10 - 50 μg/ml, která byla uchovávána v lednici. Mikrozkušavky byly umístěny do termocykléru s následujícím časovým a teplotním profilem:

5 min..... 94 °C  
 35x { 30 s..... 94 °C  
       30 s..... zvolená teplota *annealingu*  
       30 s..... 72 °C  
 7 min..... 72 °C

Počáteční teplota *annealingu* byla nastavena na 50 °C a byly na ni otestovány všechny páry primerů. Tato teplota se dále upravovala v rozmezí 44 - 69 °C u nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů. Pokud testovaný primerový pár neposkytl žádný produkt, byla teplota snížena na 48 °C dále až na 44 °C. Jestliže primery poskytly polymorfní produkt a jednotlivé alely od sebe nebyly rozlišitelné, byla teplota *annealingu* postupně zvyšována až na hodnotu 69 °C.

#### 4.4 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. Nejprve byla obě skla důkladně omyta vodou se saponátem a vydrhnuta kartáčkem. Poté se opláchla deionizovanou vodou, osušila a dvakrát opláchla 96% etanolem a nakonec osušila papírovým ubrouskem.
2. Větší sklo bylo ošetřeno přípravkem na odpuzování vody, který se používá na skla automobilů, na té ploše, kde se dotýkalo gelu. Přípravek se nechal působit 5 minut a pak bylo sklo opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno papírovým ručníkem.
3. Menší sklo bylo ošetřeno 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% etanolu s 3  $\mu$ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu na té ploše, kde se dotýkalo gelu. Roztok byl rozetřen papírovým ubrouskem a nechal se působit 5 minut, poté se sklo 4x opláchlo 96% etanolem a pokaždé osušilo papírovým ručníkem.
4. Větší sklo bylo přesunuto do digestoře a položeno na polystyrenovou desku neošetřenou stranou. Na ošetřenou plochu byly po stranách položeny dva 0,4 mm silné spacers a na ně ošetřenou plochou směrem dolů kratší sklo. Spacers se umístily až do kraje skel tak, aby se guma na nich těsně dotýkala kratšího skla.
5. Gel byl připraven smísením 60 ml 6% roztoku akrylamid: N,N'-metylenbisakrylamid 19:1, 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného a 40  $\mu$ l N,N,N,N'-tetrametylendiaminu. Připravený gel byl z kádinky pomalu přelit mezi obě skla, tak aby se nevytvořily v gelu bublinky.



6. Když byl celý prostor mezi skly vyplněn gelem, vložil se mezi skla (v tom místě, kde se naléval gel) hřebínek svou rovnou stranou asi 1 cm hluboko. Na tuto stranu byly umístěny klipsy a gel se nechal asi hodinu polymerizovat.
7. Po ztuhnutí gelu byly všechny klipsy odstraněny a sklo bylo umyto od zbytků zpolymeryzovaného gelu. Omyté sklo bylo umístěno do elektroforetické komůrky hřebínkem nahoru a dovnitř upevněno pomocí šroubovacích úchytlů.
8. Katodový i anodový prostor byl zalit 0,5 x TBE pufrem a hřebínek byl opatrně vyjmut, tak aby nedošlo k poškození gelu. Prostor mezi skly byl vyčištěn proudem pufru z injekční stříkačky. Katodový i anodový prostor byl uzavřen a na zdroji stejnosměrného proudu byla nastavena hodnota výkonu 90 W. Sklo bylo takto nahříváno po dobu 30 minut (hodnoty elektrického proudu a napětí byly 150 mA a 3000 V).
9. Pět minut před nanesením vzorků (vzniklých smísením 1 objemového dílu PCR produktu a 1 dílu nanášecího pufru) byly tyto vzorky na 3 minuty umístěny do denaturačních podmínek. Po denuraci byly okamžitě umístěny do ledové tříště, aby se zabránilo renaturaci denaturovaných vláken DNA produktů.
10. Během denaturace byl zatím vypnut zdroj stejnosměrného proudu a prostor mezi skly byl opět vyčištěn proudem z injekční stříkačky. Poté byl do této mezery vsunut hřebínek asi 1 mm hluboko, tak aby nedošlo k ulomení některého zoubku.
11. Do mezer mezi zoubky byly naneseny osmikanálovou pipetou vzorky o objemu 3  $\mu$ l. Na nanášení byly použity stejné špičky, které byly vždy vymyty nasátím pufru. Po nanesení vzorků, byl katodový prostor uzavřen a na zdroji stejnosměrného napětí byla nastavena hodnota proudu 70 W (hodnoty elektrického proudu a napětí byly 150 mA a 3000 V). Separace trvala 1,5 až 4 hodiny.
12. Během elektroforetické separace vzorků byl připraven fix/stop roztok (800 ml roztoku 10% kyseliny octové) a vývojka (800 ml roztoku 3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), která se umístila do ledničky vychladit.
13. Po uplynutí doby elektroforetické separace, byl vypnut zdroj stejnosměrného proudu, odpojeny elektrody a otevřen kanálek, kterým pufr přetekl do sběrného prostoru. Sklo bylo opatrně vyjmut, byly odstraněny spacery a hřebínek a menší sklo s gelem se pomocí nože odlepilo od většího skla.

14. Odchlípnuté menší sklo bylo umístěno do fotomisky na třepačku gelem nahoru a zalito fix/stop roztokem. Doba působení byla asi 20 minut.
15. Po uplynutí doby, byl fix/stop roztok slit zpět do kádinky, pro další použití. Poté bylo malé sklo 3 krát po 3 minutách promyto deionizovanou vodou. Následně bylo umístěno na třepačku a promýváno 5 minut v 1% roztoku HNO<sub>3</sub>, roztok byl vylit a sklo bylo důkladně 4 krát po 3 minutách omyto deionizovanou vodou.
16. Sklo s gelem bylo umístěno na třepačku a zalito 0,1% roztokem AgNO<sub>3</sub>, do kterého se těsně před použitím přidalo 1,2 ml formaldehydu, a tento roztok se nechal působit asi 30 minut.
17. Po uplynutí této doby, bylo sklo umístěno asi na 5 vteřin do misky s deionizovanou vodou a poté zpět na třepačku, kde bylo zalito vývojkou. Poté bylo pozorováno vyvíjení hnědočerných, stříbrem obarvených, proužků PCR produktů. Pokud byly dostatečně viditelné, byl přilít fix/stop roztok, který zabránil dalšímu vyvíjení.
18. Nakonec bylo sklo osušeno papírovým ručníkem a přesunuto asi na 30 minut do sušárny při 60 °C. K hodnocení byl použit negatoskop a vyhodnocené sklo bylo naskenováno do počítače pro uchování výsledků.

#### 4.5 Použité chemikálie

Akrylamid (AppliChem)

*aTaq* DNA-polymeráza (5U/μl), M1241 (Promega)

Bromfenolová modř (Serva)

Deionizovaná voda

Deoxyribonukleosidtrifosfáty (100 mmol/l, 400 μl každého), U 1240 (Promega)

Dusičnan stříbrný (Lachema)

Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)

Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na<sub>2</sub>EDTA) (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'-metylenbisakrylamid (AppliChem)  
N,N,N',N'-tetrametylendiamin (TEMED) (Serva)  
Peroxodisíran amonný (Serva)  
Proteináza K (Sigma)  
Clear Vue, Rain Repellent (Turtle WAX)  
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 40% zásobního roztoku akrylamid:N,N'-metylenbisakrylamid 19:1 po  
rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné láhvi ve 4 °C

##### **Polyakrylamidový 6% gel:**

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

**Zásobní roztok 10x TBE pufru:**

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

**Fix/stop roztok:**

88 ml ledové kyseliny octové  
800 ml deionizované vody

**Nanášecí pufr pro elektroforézu:**

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

**Roztok 1% kyseliny dusičné  $HNO_3$ :**

12 ml 65%  $HNO_3$   
800 ml deionizované vody

**Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného  $AgNO_3$ :**

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

**Vývojka:**

24 g uhličitanu sodného  $Na_2CO_3$   
800 ml deionizované vody  
umístit do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než 10 °C  
před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu$ l 1% roztoku thiosíranu  
sodného  $Na_2S_2O_3$

**Roztok 10% peroxidisíranu amonného (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>:**

1 g peroxidisíranu amonného (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
rozpustit v 10 ml deionizované vody  
uchovávat v chladniče

**Roztok hydroxidu sodného NaOH 1 mol/l:**

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

**Molekulární lepidlo:**

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

**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 Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0  
rozpustit v 900 ml deionizované vody  
doplnit deionizovanou vodou na 1 l a zfiltrvat

## 4.7 Laboratorní přístroje

Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)  
Elektroforetický zdroj EV 232 (Consort)  
Chladnička kombinovaná (Whirlpool)  
Laboratorní váhy MARK S 622 (BEL Engineering)  
Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)  
Mikropipety Finnipipette 0,5 µl až 10 µl (osmikanálová) (Labsystems)  
Mikropipety Finnipipette 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)  
Mikropipety Nichipipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)  
Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)  
Negatoskop NEGA1 (Maneko)  
Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)  
Sušárna – sterilizátor CAT 8050 (Conthern)  
Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)  
Termocyklér GenePro (BIOER technology)  
Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)  
Termocyklér XP Thermal Cyclers (BIOER technology)  
Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)  
Vortex MS2 (Ika)  
Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)  
Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

## **5. Výsledky**

















## **6. Diskuze**

**I**















## 7. Závěr

Testováním 187 párů primerů na 6 nepříbuzných jedincích marabu afrického metodou *cross-species* PCR amplifikace, jsem našla celkem 26 polymorfních mikrosatelitů. 18 polymorfních lokusů bylo amplifikováno primery, navrženými pro druhy z řádu veslonozí. Konkrétně to byly čtyři páry primerů pro tereje modronohého, tři pro kormorána ušatého, čtyři pro fregatku obecnou, dva pro pelikána severoamerického, dva pro pelikána bílého a tři pro komorána chocholatého. Zbylých 8 polymorfních lokusů, bylo amplifikováno páry primerů, nasyntetizovanými pro dva druhy z řádu plameňáci. Tři páry primerů pro plameňáka karibského a 5 párů primerů pro plameňáka růžového. Nejúspěšnějším druhem, z hlediska získání polymorfních mikrosatelitů, byl tedy plameňák růžový, jehož primery poskytly 5 polymorfních lokusů. Vzhledem k poměru počtu testovaných párů primerů a z nich získaných polymorfních produktů, byl relativně více úspěšný řád plameňáci (17 % úspěšnost) oproti řádu veslonozí (13 % úspěšnost).

## 8. Seznam použitých zkratk

A	adenin
bp	pár bází ( <i>base pair</i> )
C	cytozin
dATP	deoxyriboadenozin trifosfát
dCTP	deoxyribocytydin trifosfát
dGTP	deoxyriboguanidin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyseliny
dsDNA	dvouřetězcová DNA
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
dsDNA	dvouřetězcová DNA
dTTP	deoxyribotymidin trifosfát
G	guanin
kb	kilobáze
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné elementy ( <i>long interspersed nuclear elements</i> )
Mb	megabáze
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
SINEs	krátké rozptýlené jaderné elementy ( <i>short interspersed nuclear elements</i> )
SSRs	repetice jednoduchých sekvencí ( <i>simple sequence repeats</i> )
STRs	krátké tandemové repetice ( <i>short tandem repeats</i> )
T	thymin
Ta	teplota <i>annealingu</i>
VNTRs	variabilní počet tandemových repetice ( <i>variable number of tandem repeats</i> )

## 9. Použitá literatura

- Barlow EJ, Telford A, Cavers S (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Bennett P (2000): Demystified...Microsatellites. *Molecular Pathology* 53, 177-183.
- Brown LH, Urban EK, Newman K (1993): The birds of Africa. Vol. 1, Academic Press, London.
- Burnie D (2008): Ptáci. Obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR (1993): Incidence and origin of „null“ alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* 52, 922-927.
- Campbell NA, Reece JB (2006): Biologie. Computer Press, Brno.
- 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.
- Dearborn DC, Hailer F, Fleischer RC (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* 8, 1399–1401.
- del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona.
- de Ponte Machado M, Feldheim KA, Sellas AB, Bowie RCK (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus nocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics* 10, 1033-1036.
- Duffie C, Glenn TC, Hagen C, Parker P (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources* 8, 625-627.
- Ellegren H (2004): Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Genetics* 5, 435-445.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.



- Faircloth BC, Ramos A, Drummond H, Gowaty PA (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxii*). *Conservation Genetics* 1, 159-162.
- Fike JA, Devault TL, Rhoades OE (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* 9, 1183-1185.
- Flegr J (2009): Evoluční biologie, 2. opravené a rozšířené vydání. Academia, Praha.
- Gaisler J (1994): Úvod do zoologie obratlovců. Masarykova Univerzita, Brno.
- Galbusera P, van Dongen S, Matthysen E (2000): *Cross-species* amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1, 163-168.
- Geraci J, Gaillard M, Bechnet A, Cezilly F, Wattier RA (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- He PL, Wan QH, Fang SG, Xi IM (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics* 7, 157-160.
- Hickman CR, Peters MB, Crawford NG, Hagen G, Glenn TC, Somers CM (2009): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* 8, 1439-1441.
- Hill A, Green MC (2011): 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.
- Hudec K, Balát F, Černý V, Černý W, Ferienc 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.
- Chang Q, Coa FH, Zhu LF, Zhang BW, Zhou KY (2005): Microsatellite variation and genetic diversity in the black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* in the lower reaches of Yangtze river. *Acta Zoologica Sinica* 51, 657-663.
- Chang Q, Xie Z, Li Q, Zhou K (2009): Microsatellite loci developed for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservation Genetics* 10, 1537-1539.

- Chapuis M-P, 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.
- Jarne P, Lagoda JLP (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* 11, 424-429.
- Ji YJ, Liu YD, Ding ChQ, Zhang DX (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4, 615-617.
- 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'D (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis: a review. *Journal of Pathology* 178, 239-248.
- Lei ChZ, Fan GL, Zhang ID, Qui RB, Chen H (2005): Genetic polymorphism in a cultured population of the crested ibis *Nipponia nippon*. *Acta Zoologica Sinica* 51, 650-656.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982): *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- McGuire HL, Noor MAF (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes* 2, 170-172.
- Mercer DM, Haig SM, Mullins TD (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources* 2, 119-121.
- Morris-Pocock JA, Taylor SA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources* 10, 404-408.
- Muckley A (2001): *Leptoptilos crumeniferus*, navštívěno dne 23. 3. 2012 na [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Leptoptilos\\_crumeniferus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Leptoptilos_crumeniferus.html).
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294-307.
- Piertney SB, Goostrey A, Dallas JF, Carss DN (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology* 7, 138-140.

- Paprskářová M (2012): *Cros-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u marabu afrického (*Leptoptilos crumeniferus*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci).
- Preston EL (2005): Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Ph.D. dissertation, University of North Texas, USA.
- Primmer CR, Moller AP, Ellegren H (1996): A wide survey of *cross-species* microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5, 365-378.
- Ramel C (1997): Mini- and Microsatellites. *Environmental Health Perspectives* 105, 781-789.
- Santos MS, Gonçalves EC, Barbosa MSR, Silva A, Schneider MPC (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes* 6, 307-309.
- Sawyer GM, Benjamin RC (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes* 6, 677-679.
- Seutin G, White BN, Boag PT (1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69, 82-90.
- Shephard JM, Galbusera P, Hellemans B, Jusic A, Akhandaf Y (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics* 10, 1525-1528.
- Snustad PD, Simmons MJ (2009): Genetika. Masarykova Univerzita, Brno.
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Peters TD (1993): Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365, 274-276.
- Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J (2005): Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita, Brno.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros, 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 AM, Schable NA, Bryan AL Jr, Brisbin IL Jr, del Lama SN, Glenn TC (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3, 563-566.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10, 967-981.

- van den Bussche RA, Harmon SA, Baker RJ, Bryan AL Jr, Rodgers JA Jr, Harris MJ, Brisbin IH Jr (1999): Low levels of genetic variability in north american populations of the wood stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 116, 1083-1092.
- Vergnaud G, Deneud F (2000): Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Research* 10, 899-907.
- Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* 14, 2807-2812.
- Wang H, Lou X, Zhu Q, Huang Y, Zhou L, Zhang B (2011): Isolation and Characterization of Microsatellite DNA Markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science* 28, 606-608.
- Wilson R (2008): Sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) – Modern samples. Summer Project. Massey University, Albany.
- Yeung CKL, Hsu YC, Yao CT, LI SH (2009): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics* 10, 1081-1084.
- Zane L, Bargelloni L, Paternello T (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.
- Zima J, Macholán M, Munclinger P, Piálek J (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.