

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



**Analýza a charakteristika polymorfních  
*cross-species* mikrosatelitů u plameňáka  
růžového (*Phoenicopterus roseus*)**

**Diplomová práce**

**Barbora Málková**

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 v průběhu  
magisterského 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 čas, trpělivost, odborné rady a materiály, které mi poskytl při vypracování této diplomové práce, a také kolektivu v laboratoři populační genetiky, za jejich pomoc.

## Souhrn

Tato diplomová práce se zaměřuje na analýzu a charakteristiku polymorfních mikrosatelitů u plameňáka růžového.

Teoretická část práce se věnuje popisu plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) a jeho zařazení do systému, dále se zabývá obecnou charakteristikou mikrosatelitů, jejich vlastnostmi, strukturou, mutacemi a využitím. Na závěr teoretické části jsou popsány polymorfní mikrosatelity dosud nalezené u plameňáka růžového a také nově nalezené mikrosatelity vhodné k otestování u tohoto druhu.

V praktické části byla provedena PCR amplifikace vybraných mikrosatelitových lokusů s využitím primerů izolovaných jednak přímo od plameňáka růžového a jednak od příbuzných druhů z řádů brodiví (Ciconiiformes) a veslonoží (Pelecaniformes). PCR produkty byly podrobeny elektroforetické separaci v 6% polyakrylamidovém gelu a vzniklý elektroforetogram vyhodnocen. Zjištěné výsledky byly statisticky zpracovány pomocí programů Cervus 3.0.3 a Genepop 4.2.

Celkem bylo charakterizováno 47 mikrosatelitů s počty alel pohybujícími se od 2 do 24. Průměrný počet alel na lokus byl 5,9. Čtyři z těchto mikrosatelitů vykazovaly vazbu na pohlaví.

## Summary

This master thesis focuses on the analysis and characterization of polymorphic microsatellites in Greater Flamingo.

The theoretical part deals with the description of a Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*) and its taxonomy, discusses the general characteristics of microsatellites, their properties, structure, mutations and applications. At the end of the theoretical part the polymorphic microsatellites have been found in Greater Flamingo and newfound microsatellites suitable for testing in this species are described.

In the practical part of this thesis the PCR amplification of specific microsatellite loci was performed using primers isolated directly from Greater Flamingo and also from related species belonging to orders Ciconiiformes and Pelecaniformes. PCR products were electrophoretically separated in 6% polyacrylamide gel and the resulting elektroforetogram was evaluated. The results were statistically processed using Cervus 3.0.3 and Genepop 4.2.

Totally, 47 of polymorphic microsatellites were characterized with numbers of alleles moving in range from 2 to 24. The average number of alleles per locus was 5.9. Four of those microsatellites were sex-linked.

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>7</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>8</b>
3.1. ŘÁD PLAMENÁCI .....	8
3.2. PLAMENÁK RŮŽOVÝ .....	11
3.2.1. Zařazení plamenečka růžového do systému .....	12
3.3. MIKROSATELITY .....	13
3.3.1. Dělení mikrosatelitů .....	13
3.3.2. Mutace mikrosatelitů .....	14
3.3.3. Mikrosatelity jako DNA markery.....	15
3.3.3.1. Aplikace mikrosatelitových markerů.....	17
3.4. POLYMORFNÍ MIKROSATELITOVÉ LOKUSY U PLAMENÁKA RŮŽOVÉHO.....	17
3.5. NOVĚ NALEZENÉ MIKROSATELITY PRO ZÁSTUPCE ŘÁDU BRODIVÍ .....	21
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>22</b>
4.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	22
4.2. PCR AMPLIFIKACE .....	22
4.3. ZPRACOVÁNÍ PCR PRODUKTŮ.....	26
4.4. STATISTICKÉ HODNOCENÍ .....	27
4.5. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY .....	27
4.5.1. Použité chemikálie.....	27
4.5.2. Použité roztoky .....	28
4.6. VYBAVENÍ LABORATOŘE.....	30
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>31</b>
<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>42</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>54</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>55</b>
<b>9. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>56</b>
<b>10. PŘÍLOHY</b> .....	<b>63</b>

# 1. Úvod

Mikrosatelity jsou typem tandemových repetic o délce základní jednotky 1 až 6 bp. Jednotlivé lokusy jsou velmi variabilní co do počtu opakování základní jednotky, což spolu s jejich výskytem po celém genomu všech eukaryotických buněk činí z mikrosatelitů oblíbené molekulární markery s širokým spektrem využití.

Hlavní nevýhodou mikrosatelitů je jejich časově a finančně náročná izolace, proto se často přistupuje ke *cross-species* PCR amplifikaci, ačkoli mezidruhová přenositelnost je u mikrosatelitů možná pouze u velmi příbuzných druhů, přičemž s genetickou vzdáleností se polymorfismus mikrosatelitů snižuje.

Plameňák růžový je v systému ptáků obvykle řazen jako skupina příbuzná k řádům brodiví (Ciconiiformes) a veslonozí (Pelecaniformes), s nimiž sdílí podobnou tělesnou stavbu, nároky na prostředí i způsob přijímání potravy.

Pro plameňáka růžového (*Phoenicopus roseus*) bylo dosud izolováno 37 polymorfních mikrosatelitů. V této práci se zabývám jejich charakteristikou a dále hledáním nových polymorfních markerů testováním mikrosatelitů izolovaných pro druhy z řádů brodiví a veslonozí metodou *cross-species* PCR. Navazuji při tom na předchozí výzkum prováděný v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PŘF UPOL Drobkem (2010) a Manišovou (2011).

## **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 růžového. Jedná se o lokusy označené jako polymorfní v bakalářské práci Barbory Manišové. Tyto lokusy srovnat s polymorfními lokusy charakterizovanými v diplomové práci Aleše Drobka.



## 3. Literární přehled

### 3.1. Řád plameňáci

Plameňáci (Phoenicopteriformes) jsou jednou z nejstarších známých skupin ptáků. Fosilní zbytky současných rodů jsou dobře zdokumentovány, nejstarší jsou známy již z doby před 30 miliony lety (Šťastný *et al.*, 1998; Burnie *et al.*, 2008).

Postavení plameňáků v systému ptáků není navzdory dobrým fosilním záznamům dosud spolehlivě objasněno (Šťastný *et al.*, 1998). Anatomická podobnost je řadí nejspíše do řádu brodiví (Ciconiiformes), tradičně byli za jejich nejbližší příbuzné považováni čápi, ibisové a kolpíci (Stibley *et Corbin*, 1969). Molekulární studie založené na DNA-DNA hybridizaci ovšem ukazují příbuznost plameňáků se zástupci řádu vrubozobí (Anseriformes) (van Tuinen *et al.*, 2001; Hackett *et al.*, 2008), stejně jako výskyt parazitů rodu *Anaticola* v peří (Johnson *et al.*, 2006). Podle studií založených na morfologii mají plameňáci nejbližší potápkám (Mayr *et al.*, 2004). Existují i studie, které ukazují, že plameňáci mají velmi blízko k bahňákům (Olson *et Feduccia*, 1980). Nejasnosti ohledně nejbližší příbuzné skupiny vedly k zařazení plameňáků do samostatného řádu.

Plameňáci jsou velcí ptáci, mohou být až 145 cm vysocí. Mají dlouhé, chůdovité nohy bez opeření, které jim kromě běhu umožňují i brodit se v hlubší vodě než ostatní druhy ptáků. Přední prsty mají spojeny kožovitou blánou, zadní prst je redukován nebo chybí (Gosler, 1994; Šťastný *et al.*, 1998). Jejich nohy jim neumožňují usednout na větve (Gaisler *et Zima*, 2007).

V poměru k velikosti těla mají plameňáci velmi dlouhý krk, který tvoří 17 obratlů, zakončený poměrně malou hlavou (Šťastný *et al.*, 1998; Burnie *et al.*, 2008). Jejich zobák je vysoký, od prostředka zahnutý v tupém úhlu dolů. U kořene je krytý měkkou kůží, na špičce je však tvrdý (Hanzák *et Hudec*, 1963). Na okrajích obou částí zobáku mají dvě řady rohovitých lamel, kterými je pokryt také jazyk a které mají na povrchu vlásky (Geisler *et Zima*, 2007). Horní část zobáku je pohyblivější oproti masivnější dolní části, což plameňáky odlišuje od ostatních druhů ptáků a souvisí se specifickým způsobem získávání potravy (Hanzák *et Hudec*, 1963; Šťastný *et al.*, 1998).

Při přijímání potravy stojí plameňáci ve vodě, hlavu mají skloněnou a zobák obrácen horní stranou dolů. Přešlapováním víří bahno i s drobnými živočichy. Svrchní částí zobáku nasávají vodu, přičemž pohyby jazyka vpřed a vzad fungují jako pumpa. Vlasy na jazyku a okrajích zobáku zachycují drobné složky potravy a vedou je do jícnu. Přefiltrovanou vodu vypudí přes okraje zobáku ven. Tento úkon dokážou za minutu zopakovat až dvacetkrát. Uspořádání tohoto filtru je u každého druhu odlišné, takže druhy se mohou žít na stejných místech, aniž by si konkurovaly (Šťastný *et al.*, 1998). Některé druhy mají mřížky na okrajích zobáku tak husté, že zadržují i mikroskopické rozsivky a malé řasy. Větší druhy mohou zachycovat větší potravu – korýše, hmyz, měkkýše atd. (Hanzák *et Hudec* 1963). Při výzkumech krevního oběhu byla v zobáku plameňáků nalezena topořivá tělesa. Protože topořivá tělesa zanechávají otisk na kostech, mohl by tento objev pomoci odhalit, jaká evoluční cesta vedla k vývoji zvláštního způsobu přijímání potravy plameňáků (Holliday *et al.*, 2006).

Barva opeření plameňáků je bílá, přes intenzivní růžový nádech až po sytě červenou. Červenavé zbarvení je podmíněno karotenoidovými pigmenty získávanými z řas v potravě pomocí jaterních enzymů (Gosler, 1994; Burnie *et al.*, 2008). Mají široká křídla, která se směrem ke hrotu zeštíhlují a na koncích jsou opatřena černými letkami (Šťastný *et al.*, 1998). Při letu mají krk i nohy natažené. Malá délka křídel jim neumožňuje plachtit (Hanzák *et Hudec*, 1963). Jsou dobří plavci, ale plavou jen zřídka (Burnie *et al.*, 2008).

Charakteristickým znakem plameňáků je odpočívání na jedné noze. Vzhledem k výsledkům pozorování, které ukazují, že více ptáků stojí na jedné noze ve vodě než na souši, a že s vyšší teplotou se počet ptáků stojících na jedné noze snižuje, je hlavním důvodem pravděpodobně snaha zabránit ztrátě tělesného tepla (Anderson *et Williams*, 2010).

Pohlavní dvojtvárnost u plameňáků není vyvinuta (Hanzák *et Hudec*, 1963). Jsou monogamní a tvoří stálé páry. Samec a samice společně vytvářejí v bahně na břehu asi 30 cm vysoké kuželovité hnízdo, do kterého samice snáší nejčastěji jedno, vzácněji dvě bílá vejce. Na vejcích sedí oba partneři, a to přibližně 30 dní (Gosler, 1994, Šťastný *et al.*, 1998). Po vylíhnutí krmí rodiče mláďata výměškem z volete, který obsahuje asi 8 % bílkovin, 18 % tuků a necelé procento cukrů. Díky své výšce mohou rodiče nechávat krmící tekutinu stékat samospádem do otevřeného zobáku mláďete (Veselovský, 2001). Po několika dnech strávených na hnízdě se mláďata sdružují a

vytvářejí tisícíhlavé školky. Rodiče rozpoznávají své mládě podle hlasu. Samostatně se mláďata živí od stáří osmi až jedenácti týdnů (Burnie *et al.*, 2008). Po vylíhnutí mají mláďata bílé prachové peří a rovný zobák, který se jim zakříví až během prvních měsíců života (Hanzák *et Hudec*, 1963). Úspěšnost hnízdění je závislá na počasí a změnách stavu vody, v některých letech k hnízdění nedochází (Šťastný *et al.*, 1998). Plameňáci se dožívají kolem 27 let (Veselovský, 2001).

Jsou to společenší ptáci, kteří obvykle žijí ve velkých, druhových nebo společných koloniích, které mohou čítat i statisíce párů. Pouze populace plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) obývající Galapágy žijí v malých skupinách o 3-50 párech. Tok je velmi výrazný a je synchronizován v celé kolonii. Hlasové projevy jsou hlasité, volání doprovázejí pokyvováním hlavami. Při nedostatku potravy putují společně a hledají vody bohatší na plankton (Šťastný *et al.*, 1998, Burnie *et al.*, 2008).

Žijí v mělkých, brakických a slaných vodách s bahnitým dnem. Jsou specializovaní i na život ve velmi nepříznivých podmínkách, obývají laguny s velmi zásaditou, slanou, nebo velmi horkou vodou snesitelnou pro málo živých organismů. Žije zde však velké množství řas, rozsivek a drobných bezobratlých, které slouží plameňákům jako dostatečný zdroj potravy. Pokud se však chemismus vody změní natolik, že umožňuje život ryb, stávají se pro plameňáky závažným konkurentem. Plameňáci jsou schopni žít i ve sladké vodě (Hanzák *et Hudec*, 1963; Šťastný *et al.*, 1998).

Plameňáci jsou rozšířeni v jižní Evropě, střední a jižní Asii po Indický poloostrov, v Africe a Střední a Jižní Americe. Některé druhy jsou tažné, např. plameňák růžový táhne od Středozemního moře do tropické Afriky, na slaná jezera Východoafrické příkopové propadliny (Šťastný *et al.*, 1998; Burnie *et al.*, 2008).

Řád plameňáci zahrnuje jedinou čeleď plameňákovití (Phoenicopteridae) se třemi rody a 5 až 6 druhy (dle autora). Jedná se o plameňáka andského (*Phoenicoparrus andinus*), plameňáka chilského (*Phoenicopterus chilensis*), plameňáka Jamesova (*Phoenicoparrus Jamesi*), plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), plameňáka malého (*Phoeniconaias minor*), a plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Někteří autoři uvádějí plameňáka karibského a plameňáka růžového jako poddruhy téhož druhu (*Phoenicopterus ruber ruber* a *Phoenicopterus ruber roseus*) (del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998). Nicméně sloučení těchto druhů, které se poprvé objevilo

v roce 1983 v AOU Check-list (*The American Ornithologists' Union*, Americká ornitologická unie), nebylo nikdy podepřeno biologickými důkazy (Banks *et al.*, 2008). Nyní jsou plameňák karibský a plameňák růžový opět považováni za samostatné druhy (Knox *et al.*, 2002). Hlavními důvody jsou barva peří, která je u plameňáka růžového bílá až narůžovělá, zatímco u plameňáka karibského je růžovo-oranžová po celém těle, dále rozdíly v zabarvení zobáku, odlišné postoje i hlasové projevy – kdy plameňák růžový se ozývá krátce a dvouslabičně, zatímco volání plameňáka karibského je tříslabičné a dlouhé (Sangster, 1997).

### 3.2. Plameňák růžový

Plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*) je největším představitelem řádu. Bývá přibližně 120 – 145 cm vysoký s rozpětím křídel 140 – 170 cm a hmotností 3 – 4 kg. Samice je menší než samec a má kratší nohy (Svensson *et Grant*, 2004; Burnie *et al.*, 2008). Barva opeření je bílá s růžovým nádechem, má červené křídelní krovky a černé letky. Zobák je světle červený, pouze na špičce černý, nohy celé růžové (viz obrázek č. 1). Mladí jedinci jsou šedohnědí až bělaví, bez červené (Svensson *et Grant*, 2004).

**Obrázek č. 1** – Plameňák růžový, dospělý jedinec.



Autor: Hans Hillewaert,

zdroj: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phoenicopterus\\_roseus\\_%28Camargue%29.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phoenicopterus_roseus_%28Camargue%29.jpg)

Stejně jako ostatní druhy plameňáků získává potravu při brodění ve vodě. Krkem dosáhne až na dno a mohutným zahnutým zobákem filtruje vodu (Svensson *et* Grant, 2004). Konzumuje larvy vodního hmyzu, červovité živočichy, korýše a kousky vegetace. Je dlouhověký, nejstarší známý jedinec v přírodě se dožil 33 let, v zajetí 44 let (Burnie *et al.*, 2008).

Plameňák růžový je vysoce společenský, hnízdí ve velkých koloniích na nízkých ostrovech a březích, mělkých bahnitých pobřežích slaných jezerech, v mořských zálivech apod. Populace z jednotlivých míst jsou schopny velmi dlouhých přeletů, během noci mohou urazit až 600 km. Vyskytují se na území Afriky, v jihozápadní a jižní Asii (pobřeží Indie, na sever až ke Kazachstánu) a jižní Evropě. Nejznámější kolonií je Camargue v deltě Rhony ve Francii. Vzácně mohou zalétat i na území České republiky (Burnie *et al.*, 2008; Anonymous, 2013b). Dle IUCN se jedná o málo dotčený druh (Anonymous, 2013a).

### 3.2.1. Zařazení plameňáka růžového do systému

Zařazení plameňáka růžového do systému podle mezinárodní ornitologické unie (IOC, Gill *et* Donsker, 2013).

Říše:	živočichové	(Animalia)
Oddělení	dvoustranně souměrní	(Bilateria)
Pododdělení:	druhoústí	(Deuterostomia)
Kmen:	strunatci	(Chordata)
Podkmen:	obratlovci	(Vertebrata)
Infrakmen:	čelistnatí	(Gnathostomata)
Nadtřída:	čtyřnožci	(Tetrapoda)
Třída:	ptáci	(Aves)
Podtřída:	praví ptáci	(Ornithurae)
Infratřída:	létaví prvoptáci	(Neornithes)
Nadřád:	letci	(Neognathae)
Řád:	plameňáci	(Phoenicopteriformes)
Čeleď:	plameňákovití	(Phoenicopteridae)
Rod:	plameňák	( <i>Phoenicopterus</i> )
Druh:	plameňák růžový	( <i>Phoenicopterus roseus</i> )

### 3.3. Mikrosatelity

Mikrosatelity, nazývané též STRs (*short tandem repeats*) nebo SSRs (*simple sequence repeats*) jsou typem repetitivní DNA vyskytující se v genomech prokaryontních i eukaryotních organismů (Tóth *et al.*, 2000). Byly nalezeny i v chloroplastové a mitochondriální DNA (Powel *et al.*, 1995; Soranzo *et al.*, 1999). Jedná se o úseky DNA tvořené několikanásobným souvislým opakováním krátkých nukleotidových motivů. Délka základního motivu mikrosatelitu se udává obvykle od 1 do 6 bp (Tóth *et al.*, 2000; Ellegren, 2004; Oliveira *et al.*, 2005), i když u různých autorů se tato čísla mohou lišit. Například Chambers *et MacAvoy* (2000) mezi mikrosatelity nezapočítávají jednonukleotidová opakování.

Jako základní motivy mikrosatelitů se vyskytují všechny permutace mono-, di-, tri- a tetranukleotidových sekvencí, u delších pak pouze některé kombinace nukleotidů, například AAAAC, AAAAT nebo CCCCCG u pentanukleotidových repetice a AACCCCT, AATCCC nebo AGAGCG u hexanukleotidových repetice (Tautz, 1989; Tóth *et al.*, 2000; Ellegren, 2004).

#### 3.3.1. Dělení mikrosatelitů

Mikrosatelity lze kromě délky základní jednotky repetice, kdy mikrosatelity dělíme na mono-, di-, trinukleotidové, atd., dělit také podle struktury. Oliveira *et al.* (2006) tak dělí mikrosatelitové lokusy do 4 základních kategorií:

1. Dokonalé mikrosatelity jsou takové, jejichž struktura není přerušena, obsahují pouze opakující se motiv, např. TATATATATATATATA.
2. Nedokonalé mikrosatelity obsahují pár bází mezi opakujícím se motivem, který je odlišný od sekvence motivu, např. TATATATACTATATA.
3. U přerušovaných mikrosatelitů je do opakujícího se motivu vložena krátká sekvence, která do něj nepatří, např. TATATACGTGTATATATATA.
4. Složené mikrosatelity jsou pak tvořeny dvěma typy repetice, které k sobě těsně přiléhají, např. TATATATATAGTGTGTGTGTGT.

Tyto typy mikrosatelitů mohou být dále kombinovány, například složený mikrosatelit může být jak dokonalý, tak i nedokonalý, obsahovat přerušující sekvenci, apod.

### 3.3.2. Mutace mikrosatelitů

Rychlost mutace mikrosatelitů se uvádí v rozmezí od  $10^{-6}$  do  $10^{-2}$  na generaci, což je rychlost mnohem vyšší, než je běžná chybovost DNA polymerázy. Existují dva základní mechanismy, kterými se vysvětluje vysoká rychlost mutací mikrosatelitů, a to nerovnoměrná rekombinace a sklouznutí DNA polymerázy (Schlötterer, 2000).

Levinson *et* Gutman (1987) ve svých pokusech prokázali, že dva kmeny bakterie *Escherichia coli* jeden s funkčním a druhý s nefunkčním rekombinačním systémem vykazovaly podobnou mutační rychlost. To naznačuje, že rekombinace není hlavním mechanismem, který generuje variabilitu mikrosatelitů (Schlötterer, 2000; Oliveira *et al.*, 2006).

Ke sklouznutí DNA polymerázy dochází během replikace nebo reparace DNA. Dochází k disociaci DNA vláken a následně k jejich opětovné reasociaci, avšak v jiné pozici. Polymerace pokračuje a výsledkem je vznik řetězce nukleotidů o jednu nebo více jednotek repetice kratšího či delšího (v závislosti na tom, na kterém z vláken DNA došlo ke vzniku smyčky) (Chambers *et* MacAvoy, 2000; Schlötterer, 2000; Ellegren, 2004). Většina takto vzniklých mutací je opravena pomocí reparačních mechanismů (Ellegren, 2004). Rychlost mutace mikrosatelitů je tedy dána poměrem mezi primární rychlostí replikačního sklouznutí DNA polymerázy a efektivitou opravy reparačními systémy buňky (Schlötterer, 2000).

Na rychlost mutace mikrosatelitů má vliv celá řada faktorů. Mezi nejdůležitější faktory patří délka mikrosatelitu, počet jednotek repetice, přerušení opakujícího se motivu, nukleotidové složení motivu, délka motivu a sekvence obklopující lokus.

1. Rychlost mutace roste se zvyšujícím se počtem opakování základní jednotky. Čím vyšší počet opakujících se jednotek, tím větší pravděpodobnost sklouznutí DNA polymerázy a tedy i možnost vzniku polymorfismu (Ellegren, 2004).
2. Bodové mutace a další přerušení uvnitř sekvence mikrosatelitu snižují mutační rychlost. Každé přerušení rozděluje originální repetici na dvě kratší jednotky, což zvyšuje stabilitu lokusu, protože je snížena délka templátu pro sklouznutí DNA polymerázy (Bhargava *et* Fuentes, 2010). Pokud dojde ke vzniku smyčky zahrnující přerušení, může dojít k eliminaci tohoto přerušení (Buschiazzo *et* Gemmell, 2006).

3. Na základě nukleotidového složení motivu mají některé repetice vyšší tendenci tvořit přechodné sekundární struktury DNA. Vznik takových struktur vede ke zvýšení pravděpodobnosti sklouznutí DNA polymerázy. Nicméně vliv na mutační rychlost může mít i přítomnost různých nukleotidů jako takových. Bylo prokázáno, že mikrosatelit G<sub>17</sub> vykazuje v savčích buňkách vyšší mutační rychlost než A<sub>17</sub> (Buschiazzo *et* Gemmell, 2006; Hoshino *et al.*, 2012).
4. Co se týká délky motivu, mají nejvyšší mutační rychlost dinukleotidové repetice. Delší motivy mají vyšší disociační energii a je tedy méně pravděpodobné vytvoření jednořetězcové DNA a vznik smyčky. Navíc délka motivu ovlivňuje efektivitu reparačních mechanismů (Schlötterer, 2000; Hoshino *et al.*, 2012).
5. Na mutační rychlost mikrosatelitu může mít vliv i jeho pozice v genomu, zvláště uspořádání obklopujících sekvencí. Důležitý je obsah CG a blízkost CpG ostrovů, sekvenční rozdílnost a případná blízkost DNA vázané ke genům. To vše ovlivňuje efektivitu reparačních mechanismů. Pokud se jedná o oblasti spojené s geny, je nutné zmínit také vliv selekce. Velké přestavby v oblastech přiléhajících k mikrosatelitu mohou ovlivnit jeho genomický kontext a tím i mutační rychlost (Buschiazzo *et* Gemmell, 2006; Bhargava *et* Fuentes, 2010; Hoshino *et al.*, 2012).

Dalšími faktory ovlivňujícími rychlost mutací jsou způsob reprodukce, rychlost metabolismu, generační doba, věk a pohlaví (Buschiazzo *et* Gemmell, 2006).

### 3.3.3. Mikrosatelity jako DNA markery

DNA marker je určitá informace o organismu získaná na základě analýzy jeho DNA. Tyto markery jsou založeny na přítomnosti polymorfismu v sekvenci DNA. Jejich zdrojem jsou mutace, jejichž důsledkem je variabilita mezi jedinci, populacemi, druhy i vyššími taxonomickými skupinami. Sdílený marker pak vypovídá o příbuznosti jedinců, populací nebo druhů. Na rozdíl od fenotypových znaků nejsou tyto informace ovlivněny podmínkami prostředí a nemají vliv na fitness jedince (Liu *et* Cordes, 2004; Hoshino *et al.*, 2012).



DNA markery lze rozdělit dvou skupin. První jsou spojeny s geny o známé funkci (např. EST markery nebo izoenzymy), druhý typ je asociován s anonymními genetickými segmenty (např. RAPD nebo AFLP markery). Mikrosatelity jsou zpravidla řazeny do markerů typu II, pokud nejsou odvozeny z exprimovaných sekvencí (Liu *et Cordes*, 2004).

Mikrosatelity jsou distribuovány po celém genomu, vyskytují se především v nekódujících oblastech a v intronech (Ellegren, 2004), ale lze je nalézt i v oblastech kódujících, ze kterých jsou velmi dobře prozkoumány zejména mikrosatelity, jejichž expanze vede ke vzniku neurodegenerativních chorob u člověka, jako je Huntingtonova choroba nebo spinocereblární dystrofie (Ashley *et* Waren, 1995; Tóth *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004). Důvodem nižšího výskytu mikrosatelitů v kódujících oblastech je pravděpodobně selekční tlak proti mutacím porušujícím čtecí rámeček, proto jsou mikrosatelity v těchto oblastech zpravidla trinukleotidové (Ashley *et* Waren, 1995; Metzgar *et al.*, 2000).

Co se týká výskytu, u eukaryot se uvádí přibližně 1 mikrosatelit na 10 kb (Tautz, 1989), ovšem toto číslo se druh od druhu liší. U člověka se vyskytuje 1 mikrosatelit na 30 kb u ptáků pak 1 mikrosatelit na 20 až 39 kb (Primer *et al.*, 1997). Mikrosatelity mají poměrně malou velikost lokusu, obvykle kolem 100 bp což umožňuje jejich hodnocení pomocí PCR a elektroforetické separace (Tautz, 1989; Chambers *et* MacAvoy, 2000; Liu *et* Cordes, 2004).

Vzhledem k tomu, že výskyt jednotlivých alel u mikrosatelitů není dán přítomností odlišných nukleotidů, ale lišícím se počtem základních jednotek repeticce, jsou charakteristické vysokým PIC (*polymorphism information content*, obsah polymorfní informace), nejvyšším ze všech DNA markerů (Liu *et* Cordes, 2004).

Mikrosatelity se dědí mendelisticky jako kodominantní markery, což je jednou z jejich největších předností, spolu s hojným výskytem, náhodnou distribucí v genomu, malou velikostí lokusu a vysokým polymorfismem. Největší nevýhodou je nutnost velkých počátečních investic do jejich vývoje. Z toho důvodu se často přistupuje ke *cross-species* PCR amplifikaci, kdy jsou pro amplifikaci mikrosatelitového lokusu využity primery původně navržené pro jiný, blízké příbuzný, druh (Primer *et al.*, 1996).

### 3.3.3.1. Aplikace mikrosatelitových markerů

Mikrosatelity mají nejširší spektrum aplikací ze všech molekulárních markerů využívaných v genetických studiích. Důvodem je zejména vysoká variabilita, stabilní dědičnost podle Mendelových zákonů a spojení jejich analýzy s PCR (Oliveira *et al.*, 2006). Používají se v genomice při vytváření genetických rekombinačních map, v asociačních studiích při hledání genů spojených s chorobami, v pozičním klonování pro mapování kvantitativních znaků a v MAS (*marker assisted selection*, markery asistovaná selekce). V populačně genetických studiích se používají při charakterizaci struktury a dynamiky populací, genového toku a přiřazování jedinců ke konkrétním populacím a také v ochranářské genetice. Často se využívají k analýze příbuznosti mezi jedinci v populaci, zvláště k určení paternity, případně maternity a při studiu rozmnožovacích systémů. V systematice se využívají k určování fylogenetických vztahů. Další důležitou aplikací je forenzní analýza (Tautz, 1989; Ellegren, 2004; Zima *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2006).

## 3.4. Polymorfní mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového

Geraci *et al.* (2010) objevili u plameňáka růžového 37 polymorfních mikrosatelitových lokusů, u kterých Manišová (2011) ověřovala polymorfismus a určila podmínky amplifikace. Jedná se o lokusy PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC107, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126 a PrD139. Lokus PrC12 při prováděných testech nevykazoval polymorfismus.

Ve dvou disertačních pracích, Kapil (2005) a Preston (2005), bylo popsáno 13 polymorfních mikrosatelitových lokusů izolovaných od plameňáka karibského který je velmi blízce příbuzný plameňáku růžovému, a který je dokonce některými autory označován za jeho poddruh (např. del Hoyo, 1992). Do společné publikace (Kapil *et al.*, 2010) bylo zahrnuto 9 z nich. Drobek (2010) potvrdil, že všechny tyto mikrosatelitové lokusy (Pru $\mu$  1 až Pru $\mu$ 9) a také lokus Pru $\mu$ 13 vykazují polymorfismus u plameňáka růžového. Nicméně některé z těchto lokusů se podle jeho výsledků zdají být totožné, pouze s jinak navrženými primery.

Nádvorník *et al.* (2008) testovali metodou *cross-species* PCR 70 mikrosatelitových lokusů, které byly izolovány od zástupců řádů brodiví (Ciconiiformes), potápky (Podicipediformes) a veslonozí (Pelecaniformes) a vykazovaly u nich polymorfismus. U plameňáka růžového bylo polymorních 7 lokusů: Ah 630 izolovaný od volavky velké (*Ardea herodias*) a WS $\mu$  17 a WS $\mu$  19 izolované od nesyta lesního (*Mycteria americana*) z řádu brodiví a PcD 6 izolovaný od kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*) a PhB4, PhB2 a PhD11 izolované od kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*) z řádu veslonozí.

Drobek (2010) testoval dalších 214 párů primerů navržených pro amplifikaci polymorních mikrosatelitových lokusů u zástupců řádů brodiví, dlouhokřídli (Charadriiformes), potápky, potáplice (Gaviiformes), tučňáci (Sphenisciformes), veslonozí a vrubozobí (Anseriformes). 22 z nich amplifikovalo polymorní mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového. Z mikrosatelitových lokusů izolovaných od zástupců řádu brodiví to byly čtyři lokusy izolované od volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*), jeden izolovaný od čápa bílého (*Ciconia ciconia*), dva izolované od ibise čínského (*Nipponia nippon*) a čtyři izolované od kolpíka malého (*Platalea minor*). Od zástupců řádu dlouhokřídli byly testovány pouze dva lokusy, z nichž jeden izolovaný od alkounka drobného (*Aethia pygmaea*) vykazoval polymorfismus. Z mikrosatelitových lokusů odvozených od zástupců řádu veslonozí to pak byly tři lokusy izolované od tereje modronohého (*Sula nebouxii*), jeden izolovaný od kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), čtyři izolované od fregatky malé (*Fregata minor*), jeden izolovaný od pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), dva izolované od pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), a jeden izolovaný od tereje červenonohého (*Sula sula*).

Manišová (2011) kromě výše zmíněných lokusů izolovaných od plameňáka růžového testovala dalších 47 mikrosatelitových lokusů izolovaných od zástupců řádů brodiví a veslonozí, z nichž 5 vykazovalo polymorfismus u plameňáka růžového. Jednalo se o dva mikrosatelitové lokusy izolované od volavky purpurové (*Egretta rufescens*) z řádu brodiví a dále jeden izolovaný od faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*) a dva izolované od kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*) z řádu veslonozí.

Shrnutí úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového pomocí primerů odvozených od zástupců řádů brodiví,

dlohokřídlí, plameňáci, potápky, potáplice, tučňáci, veslonoží a vrubozobí je uvedeno v tabulce č. 1. Za úspěšnou je v tomto případě považována pouze amplifikace, která vedla ke vzniku polymorfních produktů.

**Tabulka č. 1** – Shrnutí úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového pomocí primerů odvozených od zástupců jednotlivých řádů. V tabulce je kromě řádu uveden zdrojový druh, počet testovaných lokusů, počet lokusů, které u plameňáka růžového vykazovaly polymorfismus a procentuální úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace pro daný řád.

Řád	Zdrojový druh	Počet testovaných MS	Počet polymorfních MS	Celková úspěšnost [%]
Brodiví (Ciconiiformes)	Čáp bílý ( <i>Ciconia ciconia</i> )	13	1	9,4
	Ibis čínský ( <i>Nipponia nippon</i> )	24	2	
	Ibis rudý ( <i>Eudocimus ruber</i> )	10	0	
	Kolpík růžový ( <i>Ajaia ajaja</i> )	6	0	
	Kvakoš noční ( <i>Nycticorax nycticorax</i> )	11	0	
	Nesyt lesní ( <i>Mycteria americana</i> )	15	1	
	Volavka velká ( <i>Ardea herodias</i> )	17	1	
	Volavka žlutozobá ( <i>Egretta eulophotes</i> )	18	4	
	Kolpík malý ( <i>Platalea minor</i> )	23	3	
Brodiví (Ciconiiformes)	Volavka purpurová ( <i>Egretta rufescens</i> )	12	2	9,4
Dlohokřídlí (Charadriiformes)	Alkounek dlouhokřídlý ( <i>Aethia pygmaea</i> )	2	1	50*
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopus ruber</i> )	10	10	97,9
	Plameňák růžový ( <i>Phoenicopus roseus</i> )	37	36	
Potápky (Podicipediformes)	Potápka rudokrká ( <i>Podiceps grisegena</i> )	7	0	0
Potáplice (Gaviiformes)	Potáplice lední ( <i>Gavia immer</i> )	7	0	0

**Tabulka č. 1 – Pokračování 1.**

Řád	Zdrojový druh	Počet testovaných MS	Počet polymorfních MS	Celková úspěšnost [%]
Tučňáci (Sphenisciformes)	Tučňák kroužkový ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	1	0	0
Veslonozí (Pelecaniformes)	Faeton žlutozobý ( <i>Phaethon lepturus</i> )	11	1	12,5
	Fregatka obecná ( <i>Fregata minor</i> )	18	4	
	Kormorán galapážský ( <i>Phalacrocorax harrisi</i> )	8	3	
	Kormorán chocholatý ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> )	16	2	
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	32	1	
	Kormorán velký ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )	7	1	
	Pelikán bílý ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	10	2	
	Pelikán severoamerický ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	9	1	
	Terej červenonohý ( <i>Sula sula</i> )	15	1	
	Terej guánový ( <i>Sula variegata</i> )	9	0	
	Terej modronohý ( <i>Sula nebouxii</i> )	17	3	
Vrubozobí (Anseriformes)	Kachna divoká ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	6	0	0
	Kachnice laločnatá ( <i>Biziura lobata</i> )	3	0	
	Kajka mořská ( <i>Somateria mollissima</i> )	1	0	
Vrubozobí (Anseriformes)	Pížmovka velká ( <i>Cairina moschata</i> )	3	0	0

\*Z důvodu nízkého počtu testovaných lokusů nemá v tomto případě procentuální úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace žádnou vypovídající hodnotu.

Mikrosatelity popsané v této podkapitole lze podle vztahu k mé práci rozdělit do dvou skupin. První z nich tvoří ty, které již byly u plameňáka růžového charakterizovány Drobkem (2010). Druhou skupinou jsou pak mikrosatelity které byly

u plameňáka růžového označeny jako polymorfní (Manišová, 2011), ale jejichž charakteristika dosud nebyla provedena. Analýzou a charakteristikou mikrosatelitů ze druhé skupiny se zabývá tato práce.

### **3.5. Nově nalezené mikrosatelity pro zástupce řádu brodiví**

Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového pomocí primerů izolovaných od zástupců řádu brodiví (viz tabulka č. 1), ukazuje, že zástupci řádu brodiví jsou relativně blízce příbuzní s plameňáky, a že od nich odvozené mikrosatelity lze přibližně v 9,5 % případů použít jako DNA markery u plameňáka růžového. Z toho důvodu byly v této práci otestovány i další mikrosatelitové lokusy odvozené od zástupců řádu brodiví, které byly publikovány až po dokončení bakalářské práce Manišové (2011). Jedná se o 19 mikrosatelitů odvozených od dvou druhů - čápa východního (*Ciconia boyciana*) a volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*).

Mikrosatelitové markery pro čápa východního hledali Wang *et al.* (2011) a navrhli 8 párů primerů, které amplifikují polymorfní lokusy. Nalezené mikrosatelity otestovali na 23 jedincích čápa východního a našli u nich od 2 do 8 alel.

Campanini *et al.* (2011) navrhli 11 párů primerů amplifikujících polymorfní mikrosatelitové lokusy u volavky rusohlavé. Tyto primery otestovali na vzorcích DNA 35 jedinců volavky rusohlavé z kolonie v jižní Brazílii a našli od 2 do 4 alel. Dále nově nalezené primery testovali na zástupcích dalších 7 druhů z čeledi volavkovití (Ardeidae). Pro 7 z 11 otestovaných párů primerů byla *cross-species* PCR amplifikace úspěšná u všech sedmi druhů. Počty alel nalezené na jednotlivých lokusech u těchto druhů nejsou v publikaci uvedeny.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Biologický materiál

Pro analýzu byla použita DNA 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) pocházejících ze dvou zoologických zahrad – Zoologické zahrady v Liberci a Zoologické zahrady v Praze. DNA byla izolována z krve fenol-chloroformovou metodou podle Maniatis *et al.* (1982) upravenou pro podmínky Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci.

### 4.2. PCR amplifikace

Jednotlivé mikrosatelitové lokusy byly amplifikovány pomocí PCR s využitím primerů uvedených v tabulkách č. 2, 3 a 4. PCR premix byl připravován vždy pro 22 vzorků najednou do 1,5ml mikrozkušavek. Po zvortexování a krátkém odstředění na minicentrifuze byl rozpipetován po 9  $\mu$ l do 0,2ml mikrozkušavek, do kterých byl předem napipetován 1  $\mu$ l genomické DNA o koncentraci 10 – 30  $\mu$ g/ml.

Složení PCR premixu pro 22 vzorků:

<b>Deionizovaná voda</b>	156,2 $\mu$ l
<b>Reakční pufr 10x</b> (50 mmol/l Tris-HCl, pH 8, 100 mmol/l NaCl, 0,1 M EDTA, 1 mmol/l DTT, 50% glycerol, 1% Triton X-100)	23,5 $\mu$ l
<b>Roztok MgCl<sub>2</sub></b> o koncentraci 25 nmol/l	13,9 $\mu$ l
<b>Roztok dNTPs</b> o koncentraci 20 $\mu$ mol/l	2,5 $\mu$ l
<b>Primer F</b> o koncentraci 10 $\mu$ mol/l	11,8 $\mu$ l
<b>Primer R</b> o koncentraci 10 $\mu$ mol/l	11,8 $\mu$ l
<b>aTaq DNA polymeráza</b> 5 U/ $\mu$ l	3,4 $\mu$ l

PCR probíhala v termocykléru podle následujícího časového a teplotního profilu:

1. 5 min 94 °C
2. 35x { 30 s 94 °C  
30 s teplota dle použitých primerů  
30 s 72 °C
3. 7 min 72 °C

Teplota annealingu se lišila v závislosti na použitých primerech. U mikrosatelitových lokusů označených jako polymorfní Manišovou (2011) byly informace o teplotě získány z této práce a jsou uvedeny v tabulce č. 2. V některých případech byla teplota dále upravena, aby docházelo k co nejlepší amplifikaci u všech jedinců. Nově testované lokusy, jejichž seznam je v tabulce č. 3, byly amplifikovány nejprve při 50 °C a poté byla teplota dále optimalizována, aby byl výsledný elektroforetogram co nejlépe hodnotitelný. Pro lokusy, které byly už dříve u plameňáka růžového označeny jako monomorfní (Drobek, 2010) a které zde byly znovu testovány, protože vykazovaly polymorfismus u blízce příbuzného plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), byla jako výchozí teplota zvolena optimální teplota pro amplifikaci zjištěná pro plameňáka karibského. Tyto lokusy jsou uvedeny v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 2** – Přehled mikrosatelitových lokusů, které byly Manišovou (2011) označeny jako polymorfní. V tabulce je uveden zdrojový druh, od kterého byl mikrosatelitový lokus odvozen, název lokusu, optimální teplota annealingu a čas elektroforetické separace dle Manišová (2011) a autor publikace, kde byl lokus popsán.

Zdrojový druh	Název mikrosatelitového lokusu	Teplota annealingu [°C]	Čas separace [min]	Literární zdroj
Plameňák růžový ( <i>Phoenicopterus roseus</i> )	PrA2	67	210	Geraci <i>et al.</i> (2010)
	PrA3	67	150	
	PrA9	65	90	
	PrA102	65	180	
	PrA103	68	150	
	PrA104	66	150	
	PrA105	65	120	



Tabulka č. 2 – Pokračování.

Zdrojový druh	Název mikrosatelitového lokusu	Teplota annealingu [°C]	Čas separace [min]	Literární zdroj
Plameňák růžový ( <i>Phoenicopterus roseus</i> )	PrA110	68	150	Geraci <i>et al.</i> (2010)
	PrA111	66	180	
	PrA113	64	150	
	PrB1	65	180	
	PrB2	69	180	
	PrB3	68	150	
	PrB102	66	150	
	PrB105	66	180	
	PrB110	66	150	
	PrC1	63	150	
	PrC6	65	90	
	PrC101	65	150	
	PrC109	62	150	
	PrC117	54	180	
	PrC122	60	150	
	PrD3	65	90	
	PrD4	65	120	
	PrD5	65	240	
	PrD7	62	240	
	PrD9	62	180	
	PrD10	68	120	
	PrD12	66	180	
	PrD102	62	150	
	PrD105	66	120	
	PrD108	63	90	
	PrD117	66	210	
PrD121	64	150		
PrD126	63	180		
PrD139	65	180		
Kormorán chocholátý ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> )	Phaari03	52	240	Barlow <i>et al.</i> (2010)
	Phaari05	50	135	
Volavka purpurová ( <i>Egretta rufescens</i> )	Er23	54	180	Hill <i>et Green</i> (2010)
	Er31	52	180	
Faeton žlutozobý ( <i>Phaethon lepturus</i> )	P3F7	65	150	Humeau <i>et al.</i> (2010)

**Tabulka č. 3** – Přehled nově testovaných mikrosatelitových lokusů. Tabulka obsahuje zdrojový druh lokusu, jeho název a autora publikace.

Zdrojový druh	Název lokusu	Literární zdroj
Čáp východní ( <i>Ciconia boyciana</i> )	Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168, Cbo235	Wang <i>et al.</i> (2011)
Volavka rusohlavá ( <i>Bubulcus ibis</i> )	Bi01, Bi08, Bi13, Bi15, Bi18, Bi20, Bi22, Bi26, Bi28, Bi29, Bi30	Campanini <i>et al.</i> (2012)

**Tabulka č. 4** – Přehled mikrosatelitových lokusů, které byly Drobkem (2010) označeny jako monomorfní, a které byly opětovně testovány z důvodu výskytu polymorfismu u blízce příbuzného plameňáka karibského. V tabulce je uveden zdrojový druh, od kterého byl mikrosatelitový lokus odvozen, název lokusu, teplota annealingu a čas separace podle Drobka (2010) a autor publikace, kde byl lokus popsán.

Zdrojový druh	Název mikrosatelitového lokusu	Teplota annealingu [°C]	Čas separace [min]	Literární zdroj
Čáp čínský ( <i>Nipponia nippon</i> )	NnNF5	55	240	Ji <i>et al.</i> (2004)
Ibis rudý ( <i>Eudocimus ruber</i> )	Eru03	55	180	Santos <i>et al.</i> (2006)
	Eru06	64	150	
	Eru11	58	180	
Kormorán galapážský ( <i>Phalacrocorax harrisi</i> )	PhG8	52	180	Duffie <i>et al.</i> (2008)
Nesyt lesní ( <i>Mycteria americana</i> )	WS2	58	120	van den Bussche <i>et al.</i> (1999)
	WSμ20	53	150	Tomasulo-Seccomandi <i>et al.</i> (2003)
Potáplice lední ( <i>Gavia immer</i> )	GimC5	52	180	McMillan <i>et al.</i> (2004)
Terej modronohý ( <i>Sula nebouxii</i> )	BOOB-RM4-A08	59	180	Faircloth <i>et al.</i> (2009)

### 4.3. Zpracování PCR produktů

Separace PCR produktů probíhala v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek. Postup byl optimalizován pro použití vyhřívané elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra s tloušťkou gelu 0,4 mm a rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm.

Obě skla byla nejprve umyta saponátem pomocí kartáčku a opláchnuta deionizovanou vodou. Větší sklo bylo na ploše, která se bude dotýkat gelu, ošetřeno přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů, opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno. Menší sklo bylo na ploše, která se bude dotýkat gelu, potřeno molekulárním lepidlem a po zaschnutí čtyřikrát opláchnuto ethanolem.

Na okraj většího skla byly vloženy spacers o tloušťce 0,4 mm. Na ně bylo přiloženo menší sklo ošetřenou plochou dolů a zajištěno pomocí klipsů.

Do prostoru, který vznikl mezi skly, byl nalit roztok 6% polyakrylamidového gelu. V místě přesahu většího skla byl vložen hřebínek (rovnou stranou do gelu) a zafixován klipsy.

Po přibližně 60 minut trvající polymerizaci byly klipsy odstraněny, skla s gelem byla omyta od přebytečných kousků gelu a upevněna do elektroforetické komůrky. Katodový i anodový prostor byl po rysku naplněn 0,5x TBE pufrem a hřebínek byl vyjmut ven. Komůrka byla připojena ke zdroji stejnosměrného proudu (90 W, 3000 V, 150 mA). Gel byl předehříván, dokud nedosáhl teploty přibližně 50 °C.

Po nahřátí byl gel odpojen od zdroje proudu, prostor hřebínku byl vyčištěn pomocí injekční stříkačky od bublin a zbytků gelu a byl nasazen hřebínek zuby asi 1 mm hluboko do gelu. Vznikly tak jamky, do kterých mohly být nanесeny vzorky.

PCR produkty byly smíchány s 5  $\mu$ l nanášecího pufru a denaturovány. Po denuraci byly ihned vloženy do ledové tříště a nanесeny po 2  $\mu$ l (v případě potřeby i po 0,5  $\mu$ l) do jamek na gelu.

Následně byla elektroforetická komůrka znovu připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Separace PCR produktů probíhala při 70 W (3000 V/150 mA). Délka separace závisela na velikosti amplifikovaných PCR produktů a pohybovala se od 90 do 240 minut.

Během doby, kdy probíhala separace, byly připraveny roztoky pro pozdější vymývání gelu a následnou vizualizaci separovaných PCR produktů. Složení jednotlivých roztoků je popsáno v kapitole Použité roztoky.

Po dokončení separace byla komůrka odpojena od zdroje, skla s gelem byla vyjmuta a rozlepena od sebe. Gel zůstal přilepený na menším skle ošetřeném molekulárním lepidlem. Toto sklo bylo vloženo nejprve na 20 minut do Fix-stop roztoku, aby došlo k zafixování separované DNA, poté bylo důkladně promyto deionizovanou vodou a vloženo na 5 minut do 1% roztoku kyseliny dusičné. Pro lepší průnik roztoků do gelu byla miska se sklem během fixace i promývání kyselinou dusičnou umístěna na třepačce. Fix-stop roztok byl po ukončení působení uchován a použit později k zastavení vyvolávání.

Gel byl opět několikrát promyt vodou. Následovalo umístění gelu do 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného s 1,2 ml formaldehydu, kde byl gel ponechán 30 minut. Poté byl na několik vteřin ponořen do deionizované vody a následně vyvolán pomocí vychlazené vývojky. Po dostatečném obarvení bandů bylo vyvolávání zastaveno přilitím Fix-stop roztoku.

Po vysušení gelu byl elektroforetogram vyhodnocen. Nepotřebný gel byl odlepen od skla v roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l a sklo bylo umyto pro další použití.

## **4.4. Statistické hodnocení**

Získané genotypy všech 22 jedinců pro jednotlivé lokusy byly statisticky zpracovány pomocí programů pro populační genetiku Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.2 (Rousset, 2008). Program Cervus 3.0.3 slouží ke stanovení pozorované a očekávané heterozygotnosti, přítomnosti nulových alel a případného odchýlení od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Pomocí webové verze programu Genepop 4.2 pak bylo zjištěno, zda jsou lokusy ve vazbě.

## **4.5. Chemikálie a roztoky**

### **4.5.1. Použité chemikálie**

Akrylamid	(Applichem)
aTaq DNA-polymeráza (5U/μl), M1241	(Promega)
Bromfenolová modř	(Serva)
Clear Vue, Rain Repellent	(Turtle WAX)

dNTPs (100 mmol/l, 400 µl každého), U1240	(Promega)
Deionizovaná voda	
Dusičnan stříbrný	(Sigma)
Ethanol – 96% roztok	(Lihovar Vrbátky)
Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na <sub>2</sub> EDTA)	(Lachema)
Formaldehyd	(Lachema)
Formamid	(Lachema)
Hydroxid sodný	(Lachema)
Kyselina boritá	(Lachema)
Kyselina dusičná – 65% roztok	(Lachema)
Kyselina octová – ledová	(Lachema)
3-methakryloxypropyltrimethoxysilan	(Serva)
Močovina	(Lachema)
N, N' - methylenbisakrylamid	(Applichem)
N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED)	(Serva)
Peroxodisíran amonný	(Serva)
Thiosíran sodný	(Lachema)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	(AppliChem)
Uhličitan sodný	(Lachema)
Xylenová modř (Xylencyanol FF)	(AppliChem)

#### 4.5.2. Použité roztoky

##### *Akrylamid (6% zásobní roztok)*

420 g močoviny

484 ml deionizované vody

50 ml 10 x TBE

150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N, N' - methylenbisakrylamid 19:1

- po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

##### *Dusičnan stříbrný AgNO<sub>3</sub> (0,1% roztok)*

800 ml deionizované vody

0,8 g dusičnanu stříbrného

- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

***Fix-stop roztok***

800 ml deionizované vody  
88 ml ledové kyseliny octové

***Hydroxid sodný NaOH (1 mol/l) (roztok)***

40 g hydroxidu sodného  
- doplnit deionizovanou vodou do 1 l

***Kyselina dusičná HNO<sub>3</sub> (1% roztok)***

800 ml deionizované vody  
12 ml 65% kyseliny dusičné

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

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

***Peroxodisíran amonný (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (10% roztok)***

1 g peroxodisíranu amonného  
- rozpustit v 10 ml deionizované vody

***Polyakrylamidový gel (6%)***

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

***Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu (molekulární lepidlo)***

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

***TBE pufr (zásobní roztok 10x)***

108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)  
55 g kyseliny borité H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

40 ml roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0

- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

### ***Vývojka***

800 ml deionizované vody

24 g uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

- vychladit na teplotu nižší než 10 °C

- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

## **4.6. Vybavení laboratoře**

Elektroforetický zdroj EV232	(Consort)
Chladnička kombinovaná	(Whirlpool)
Laboratorní váhy Mark S622	(BEL Engineering)
Mikropipeta FinnpiPETTE 0,5 až 10 µl (osmikanálová)	(Labsystems)
Mikropipeta FinnpiPETTE 0,3 µl až 1 ml	(Labsystems)
Mikropipety NichipET EX 0,5 µl až 1 ml	(Nichiryo)
Minicentrifuga Spectrafuge Mini	(Clever Scientific)
Negatoskop NEGA1	(Maneko)
Sekvenační elektroforetická komůrka S2	(Whatman Biometra)
Sušárna CAT 8050	(Contherm)
Temperovaný blok Dry-block DB-2D	(Labnet International)
Termocyklér Gene-Pro	(BIOER technology)
Termocyklér PTC 100-96 VHB	(MJ Research)
Termocyklér XP Thermal Cycler	(BIOER technology)
Třepačka Orbit 1 900	(Labnet International)
Vortex MS2	(Ika)
Výrobník deionizované vody typ 02	(AquaOsmotic)
Výrobník ledu Icematic F100 Compact	(Castel Mac)

## **5. Výsledky**

























## **6. Diskuze**

























## 7. Závěr

V této diplomové práci jsem se zabývala analýzou a charakteristikou polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*).

Největší skupinu analyzovaných mikrosatelitů tvořily mikrosatelity izolované přímo od plameňáka růžového. U všech 37 jsem potvrdila polymorfismus, počet alel se pohyboval od 2 do 24 s průměrem 7,49 alely na lokus. Průměrná heterozygotnost byla 0,617 a 2 mikrosatelity byly vázány na pohlaví.

Dále jsem testovala 19 mikrosatelitů nově izolovaných pro zástupce řádu brodiví (Ciconiiformes) mezi kterými jsem našla 2 polymorfní. Mezi 9 mikrosatelity, které jsem retestovala, protože ačkoli byly již dříve u plameňáka růžového označeny za nepolymorfní, u blízce příbuzného plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) vykazovaly polymorfismus, jsem našla 4 polymorfní. Těchto 6 mikrosatelitů jsem spolu se 4 dalšími, které byly označeny za polymorfní Manišovou (2011) charakterizovala stejným způsobem jako mikrosatelity odvozené od plameňáka růžového. Měly od 2 do 6 alel s průměrem 3 alely na lokus. Průměrná heterozygotnost byla 0,355 a 2 mikrosatelity byly vázány na pohlaví.

## 8. Seznam použitých zkratek

A	adenin
AOU	Americká ornitologická unie ( <i>The American Ornithologists' Union</i> )
bp	pár bází ( <i>base pair</i> )
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleozid trifosfát
G	guanin
H <sub>o</sub>	pozorovaná heterozygotnost ( <i>observed heterozygosity</i> )
H <sub>E</sub>	očekávaná heterozygotnost ( <i>expected heterozygosity</i> )
IOC	Mezinárodní ornitologická unie ( <i>International Ornithological Committee</i> )
IUCN	Mezinárodní unie pro ochranu přírody ( <i>International Union for Conservation of Nature</i> )
kb	kilobaze
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
SSRs	repetice jednoduchých sekvencí ( <i>Simple Sequence Repeats</i> )
SRTs	krátké tandemové repetice ( <i>Short Tandem Repeats</i> )
T	tymin
T <sub>a</sub>	teplota annealingu



## 9. Použitá literatura

- Anderson, M.J., Williams, S.A. (2010): Why do flamingos stand on one leg? *Zoo Biology* 29, 365-374.
- Anonymous (2013a): BirdLife International 2012. *Phoenicopterus roseus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. Přístup z: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org), navštíveno dne 14. 4. 2013.
- Anonymous (2013b): BirdLife International. Species factsheet: *Phoenicopterus roseus*. Přístup z: <http://www.birdlife.org>, navštíveno dne 14. 4. 2013.
- Ashley, C.T., Warren, S.T. (1995): Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annual Reviews Genetic* 29, 703-28.
- Banks, R.C., Chesser, T., Cicero, C., Dunn, J.L., Kratter, A.W., Lovette, I.J., Rasmussen, P.C., Remsen, J.V. Jr, Rising, J.D., Stotz, D.F., Winker, K. (2008): Forty-ninth supplement to the American Ornithologists' Union Check-list of North American birds. *The Auk* 125, 758-768.
- Barlow, E.J., Telford, A., Daunt, F., Cavers, S. (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Bartoňková, I. (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Bhargava, A., Fuentes, F.F. (2010): Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology* 44, 250-266.
- Burianová, E. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Burnie, D., Hoare, B., DiCostanzo, J. (2008): Ptáci, obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha.
- Buschiazzo, E., Gemmell, N. J. (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28, 1040-50.

- Cahlíková, R. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Campanini, E.B., Sanches, A., Hatanaka, T., del Lama, S.N. (2012): Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from cattla tret (*Bubulcus ibis*) and cross-amplification in other Ardeidae species. *Conservation Genetic Resources* 4, 707-709.
- Dai, Y., Zhou, X., Fang, W. (2013): Development and cross-species transferability of 23 microsatellite markers from the vulnerable Chinese Egret (*Egretta eulophotes*) using 454 sequencing. *Conservation Genetics Resources* 5, 1-4.
- Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Krupa, A.P., Stewart, I.R.K., Skjelseth, S., Jensen, H., Ball, A.D., Spurgin, L.G., Mannarelli, M-E., Nakagawa, S., Schroeder, J., Vangestel, C., Hinten, G.N., Burke, T. (2012): Microsatellite resources for Passeridae species: a predicted microsatellite map of the house sparrow *Passer domesticus* 12, 501-523.
- del Hoyo J., Elliot A., Sargatal, J. (1992): Handbook of the Birds of the world. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona.
- Drobek, A. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Duffie, C., Glenn, T.S.C., 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.
- Faircloth, B.C., Ramos, A., Drummond, H., Gowaty, P.A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxii*). *Conservation Genetics Resources* 1, 159-162.
- Gaisler J., Zima J. (2007): Zoologie obratlovců. Vydavatelství Academia, Praha.

- Geraci J., Gaillard M., Bechet A., Cezilly F., Wattier R.A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Gill, F., Donsker, D. (2013): IOC World Bird List (v 3.4). Přístup z: <http://www.worldbirdnames.org>, navštíveno dne 19. 7. 2013.
- Gosler, A. (1994): Atlas ptáků světa. Příroda, Bratislava.
- Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K-L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C., Yuri, T. (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763-1768.
- Hanzák, J., Hudec, K. (1963): Světem zvířat. Část 1, Ptáci. Albatros, Praha.
- Hill, A., Green, M.C. (2010): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* 3, 13-15.
- Holliday, C.M., Ridgely, R.C., Balanoff, A.M., Witmer, L.M. (2006): Cephalic vascular anatomy in flamingos (*Phoenicopterus ruber*) based on novel vascular injection and computed tomographic imaging analyses. *The Anatomical Record Part A* 288, 1031-1041.
- Hoshino, A.A., Bravo, J.P., Nobile, P.M., Morelli, K.A. (2012): Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. Genetic Diversity in Microorganism, InTech. Přístup z: <http://www.intechopen.com/books/geneticdiversity-in-microorganisms/microsatellites-as-tools-for-genetic-diversity-analysis>.
- Humeau, L., da Silva, D., Guérin, F., Jaquement, S., Requier, J-B., le Corne, M. (2010): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Pheathon lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Chambers, G.K., MacAvoy, E.S. (2000): Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 126, 455-476.
- Chmelařová, A. (2012): Charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) a pelikána kadeřavého (*Pelecanus*

- crispus*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Ji, Y-J., Liu, Y-D., Ding, Ch-Q., Zhang, D-X. (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4, 615-617.
- Johnson, K.P., Kennedy, M., McCracken, K.G. (2006): Reinterpreting the origins of flamingo lice: cospeciation or host-switching? *Biology Letters* 2, 275-278.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. (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. Dissertation. University of North Texas, USA.
- Kapil R., Sawyer G.M., Presto L., Benjamin R.C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Knox, A.G. Collinson, M., Helbig, A.J., Parkin, D.T.; Sangster, G. (2002): Taxonomic recommendations for British birds. *Ibis* 144, 707-710.
- Levinson, G., Gutman, G.A. (1987): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4, 203-221.
- Li, Y-Ch., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E. (2004): Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21, 991-1007.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F. (2004): DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1-37.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982): Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 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).

- Mayr, G. (2004): Morphological evidence for sister group relationship between flamingos (Aves: Phoenicopteridae) and grebes (Podicipedidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 140, 157-169.
- McMillan, A.M., Bagley, M.J., Evers, D.C. (2004): Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). *Molecular Ecology Notes* 4, 297-299.
- Metzgar, D., Bytof, J., Wills, Ch. (2000): Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10, 72-80.
- Nádvořník, P., Drobek, A., Čihák, K. (2008): Microsatellite markers for the study of paternity in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*) and Caribbean Flamingo (*P. ruber*). *Journal of Agrobiology* 25, 93-96.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L.C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294-307.
- Olson, S., Feduccia, A. (1980): Relationships and evolution of flamingos (Aves, Phoenicopteridae). Smithsonian Institution Press, Washington.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., McNicol, J.W., Machray, G.C., Doyle, J.J., Tingey, S.V., Rafalski, J.A. (1995): Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology* 5, 1023-1029.
- Preston, E.L. (2005): Isolation and characterization of polymorphic loci from the caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): new tools for wildlife management. Dissertation. University of North Texas, USA.
- Primmer, C.R., Møller, A.P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5, 365-378.
- Primmer, C.R., Raudsepp, T., Chowdhary, B.P., Møller, A.P., Ellegren, H. (1997): Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* 7, 471-482.
- Riordan, J., Gardner, M.G., Fitch, A.J., Johnston, G.R. (2012): 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.
- Sangster, G. (1997): Species limits in flamingos, with comments on lack of consensus in taxonomy. *Dutch Birding* 19, 193-198.
- Santos, M.S., Concalves, E.C., Barbosa, M.S.R., Silva, A., Schneider, M.P.C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* - Threskiornithidae-Aves). *Molecular Ecology Notes* 6, 307-309.
- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365-371.
- Soranzo, N., Provan, J., Powel, W. (1999): An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42, 158-161
- Sibley, Ch.G., Corbin K.W. (1969): The relationships of the flamingos as indicated by the egg-white proteins and hemoglobins. *The Condor* 71, 155-179.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): Svět zvířat IV. Ptáci (1). Albatros, Praha.
- Svensson L., Grant P.J. (2004): Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého Východu. Nakladatelství Svojtka&Co., Praha.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463-6471.
- Tomasulo-Seccomandi, A.M., Schable, N.A., Bryan, A.L. Jr., Brisbin, I.L. Jr., del Lama, S.N., Glenn, T.C. (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, R.A., Harmon, S.A., Baker, R.J., Bryan, A.L. Jr., Rodgers, J.A. Jr., Harris M.J., Brisbin, I.L. (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the Wood Stork (*Mycteria Americana*). *The Auk* 116, 1083-1092.

- van Tuinen, M., Butvill, D.B., Kirsch, A.W.J., Hedges, S.B. (2001): Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proceedings of the Royal Society London B* 268, 1-6.
- Veselovský, Z. (2001): *Obecná ornitologie*. Academia, Praha.
- Wang H., Lou H., 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.
- Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, J. (2004): *Genetické metody v zoologii*. Nakladatelství Karolinum, Praha.

## **10. Přílohy**



