

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2013

Iveta Bartoňková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species*
mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*)
a pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*)**

Diplomová práce

Iveta Bartoňková

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 svého 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 odborné rady, trpělivost a čas, který mi v průběhu diplomové práce věnoval, poskytnuté materiály, jeho přátelský přístup a motivaci pro mé další studium.

Souhrn

Hledání mikrosatelitových lokusů *de novo* je časově i finančně náročné. Doposud byly v rámci rodu pelikán mikrosatelity odvozeny *de novo* pouze od pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána severoamerického (*P. erythrorhynchos*). Tato diplomová práce je zaměřena na *cross-species* PCR amplifikaci u pelikána bílého a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). K nalezení polymorfních lokusů u daných dvou druhů pelikánů byly použity mikrosatelitové lokusy odvozené od příbuzných druhů ptáků. První skupinou mikrosatelitů zvolených pro testování v rámci této práce byly lokusy, které poskytly polymorfní produkt u daných druhů pelikánů v rámci předchozího výzkumu v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL zahrnující bakalářskou práci Buržáková (2011) a diplomové práce Ranochová (2008) a Mikulová (2010). Další skupinou byly mikrosatelitové lokusy v předchozích pracích označené u daných druhů za monomorfní, ale které poskytly polymorfní produkt u některého z ostatních druhů pelikánů. Poslední skupinu pak tvořily mikrosatelity odvozené *de novo* od čápa východního (*Ciconia boyciana*) a volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*), které byly v této práci u pelikánů testovány poprvé. V průběhu této práce bylo nalezeno, ověřeno a charakterizováno celkem 82 párů primerů amplifikujících 84 polymorfních lokusů u pelikána bílého. Z těchto 82 párů primerů poskytujících polymorfní produkt bylo 10 párů primerů odvozeno *de novo* od pelikána bílého a v rámci této práce byly zjištěny jejich genotypy kvůli analýze vazby s ostatními charakterizovanými polymorfními lokusy. U pelikána skvrnozobého jsem pak našla 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů. U všech těchto lokusů byly zjištěny alelové konstituce u většího počtu jedinců a následně byly charakterizovány s pomocí statistických programů. Na základě získaných dat byly stanoveny sady mikrosatelitových lokusů, které by bylo možno využít k ověření paternity u těchto dvou druhů pelikánů a pro populačně-genetické studie. Byly nalezeny také lokusy vázané na pohlaví, z nichž jeden lokus je univerzálním pohlavním markerem pro všechny doposud zkoumané druhy pelikánů.

Summary

Searching for microsatellite loci de novo is time and money consuming process. So far, de novo microsatellites were derived only from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and American White Pelican (*P. erythrorhynchos*). This thesis is focused on cross-species PCR amplification in Great White Pelican and Spot-billed Pelican. Microsatellites originally derived from DNA of closely related species were used to test polymorphism in these two pelican species. Microsatellites, that were previously found to be polymorphic in DNA of these two pelican species during the research in Laboratory of Population Genetics at the Department of Cellular Biology and Genetics including bachelor thesis Buržáková (2011) and master thesis Ranochová (2008) and Mikulová (2010), were tested as first. Then, microsatellite loci previously marked as non-polymorphic but that amplified polymorphic product in other species of Pelecanidae family, were tested once again. At last, microsatellites derived from Oriental Stork (*Ciconia boyciana*) and Cattle Egret (*Bubulcus ibis*), which were not tested before in Pelecanidae family, were tested for polymorphism. During this thesis, totally 82 polymorphic primer pairs amplifying 84 microsatellite loci were found and characterized in Great White Pelican, 18 polymorphic loci in Spot-billed Pelican respectively. Ten of 82 polymorphic primer pairs found in Great White Pelican were originally derived from this species and genotyped during this thesis to analyze linkage of the loci. Genotyping was conducted for all of these polymorphic loci in higher number of individuals and all of these loci were characterized using statistical programs. Based on obtained data, sets of microsatellite loci were selected to be used for paternity confirmation and population studies. Sex-linked loci were also found and one of them that seems to be universal marker for sex determination for all pelican species tested so far.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíle práce	8
3	Literární přehled	9
3.1	Fylogenetické vztahy řádu veslonohých (Pelecaniformes)	9
3.2	Čeď pelikánovití	13
3.3	Mikrosatelity	16
3.3.1	Hledání mikrosatelitových lokusů	17
3.3.2	Analýza mikrosatelitů	17
3.4	Mikrosatelity u pelikánovitých	18
3.4.1	Mikrosatelitové lokusy odvozené <i>de novo</i>	18
3.4.2	<i>Cross-species</i> PCR amplifikace	19
3.4.3	Nově objevené mikrosatelity potenciálně vhodné ke <i>cross-species</i> PCR amplifikaci u pelikánů.....	24
4	Materiál a metodika	25
4.1	Biologický materiál.....	25
4.2	Izolace genomické DNA z ptačí krve	25
4.3	Mikrosatelitové lokusy použité ke <i>cross-species</i> PCR amplifikaci u pelikána bílého a pelikána skvrnozobého	26
4.4	PCR.....	29
4.5	Postup analýzy PCR produktů	30
4.6	Statistické zpracování experimentálních dat.....	32
4.7	Vybavení laboratoře.....	32
4.8	Seznam použitých chemikálií	33
4.9	Seznam použitých roztoků.....	34
5	Výsledky	37
6	Diskuze	56
7	Závěr	71
8	Seznam použitých zkratk	72
9	Seznam použité literatury	73
10	Přílohy	78

1 Úvod

Mikrosatelity jsou tandemové repetitivní sekvence DNA vyskytující se u prokaryotních i eukaryotních organizmů, a to v kódujících i nekódujících oblastech. Díky vysokému stupni polymorfizmu nacházejí své uplatnění při ověřování paternity, při populačně-genetických či fylogenetických studiích, ale i v medicíně a při forenzních analýzách.

Tato diplomová práce se zabývá hledáním polymorfních *cross-species* mikrosatelitových lokusů u pelikána bílého (*P. onocrotalus*) a u pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*) a navazuje na předchozí výzkum v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL. K tomuto účelu budou použity primery, které již u daných druhů pelikánů byly prohlášeny za polymorfní v předchozích bakalářských a diplomových pracích. Dále pak budou retestovány lokusy označené v minulosti u zmíněných druhů monomorfní, ale poskytly polymorfní produkt u alespoň jednoho z dalších druhů pelikánů. Poslední skupinou testovaných primerů budou lokusy, které byly odvozeny *de novo* od čápa východního (*Ciconia boyciana*) a volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*), ale u pelikánů dosud nebyly testovány.

U všech nalezených polymorfních lokusů budou zjištěny alelové konstituce u 21 nepřibuzných jedinců pelikána bílého, resp. u 17 jedinců pelikána skvrnozobého tvořících chovnou skupinu. Následně budou tyto lokusy charakterizovány pomocí statistických programů Cervus a Genepop.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace a charakteristika polymorfních mikrosatelitových lokusů na DNA nepříbuzných jedinců pelikána bílého a pelikána skvrnozobého; jedná se o lokusy označené jako polymorfní v diplomových pracích Adély Ranochové a Veroniky Mikulové a v bakalářské práci Kateřiny Buržákové.

3 Literární přehled

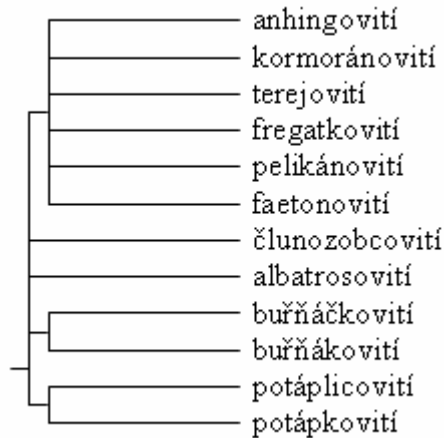
3.1 Fylogenetické vztahy řádu veslonohých (Pelecaniformes)

Řád veslonohých (Pelecaniformes) bývá v současné době dělen na dva podřády – Phaethonthes a Pelecani (del Hoyo *et al.*, 1992). První zmíněný podřád je tvořen jedinou čeledí faetonovitých (Phaethontidae), druhý pak pěti čeleděmi – anhingovití (Anhingidae), fregatkovití (Fregatidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae), pelikánovití (Pelecanidae) a terejovití (Sulidae).

Veslonozí byli až donedávna bez pochybností považováni za monofyletickou skupinu (Cracraft, 1985). Toto tvrzení bylo založeno na morfologických a anatomických znacích společných všem šesti čeledím, a to hlavně na noze se všemi čtyřmi prsty spojenými plovací blanou (tzv. veslovací noha) a na přítomnosti hrdelního vaku. Fylogenetické studie předpokládaly, že je nepravděpodobné, aby se tyto znaky v průběhu evoluce vyvinuly více než jednou. Kromě monofyletičnosti této skupiny byly zkoumány také fylogenetické vztahy v rámci veslonohých i příbuzenské vztahy s ostatními řády skupiny Neoaves. Za blízké příbuzné jsou považováni trubkonosí (Procellariiformes) a brodiví (Ciconiiformes), i když jediným důkazem dlouho byla jen morfologická podobnost fregatek a albatrosů. Velmi diskutovanou otázkou je neustále příbuznost čeledi pelikánovitých konkrétně se dvěma zástupci řádu brodiví, a to s člunozobcem africkým (*Balaeniceps rex*) a kladivoušem africkým (*Scopus umbretta*).

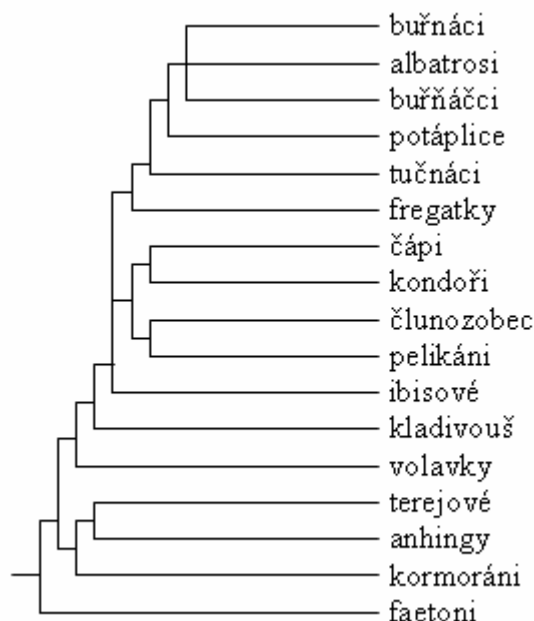
Cracraft (1985) provedl numerickou kladistickou analýzu pro ověření monofyletičnosti řádu veslonohých (výsledek analýzy zobrazen na Obr. č. 1). K tomuto účelu použil 52 morfologických znaků, z nichž 12 vyhodnotil jako synapomorfie skupiny veslonohých a prohlásil tak tento řád za monofyletickou skupinu. Na základě výsledků kladistické analýzy také prohlásil faetonovité za sesterskou skupinu ostatních čeledí, které rozdělil na dvě vývojové větve, kde fregatkovití tvoří první větev, ostatní 4 čeledi pak větev druhou. Zároveň prohlásil řád trubkonosí za nejbližší příbuzné veslonohým a na základě výsledků své analýzy zamítl jakýkoliv fylogenetický vztah mezi pelikány a člunozobcem africkým, který by měl podle některých autorů zaujímat místo blízko čeledi pelikánovitých.

Obr. č. 1: Fylogenetické vztahy řádu veslonohých podle Cracraft (1985).



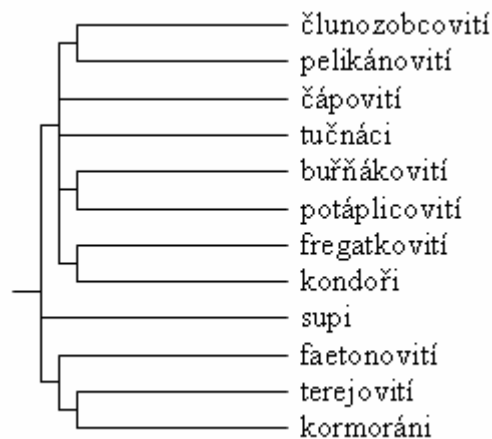
První fylogenetická analýza založená na molekulárních datech byla práce Sibley *et Ahlquist* (1990). Autoři v této publikaci využili data získaná DNA-DNA hybridizací k porovnání genomů veslonohých s hlavními skupinami žijících ptáků. Největším rozdílem mezi výsledky morfologických studií a DNA-DNA hybridizace byla příbuznost pelikánovitých s člunozobcem africkým, a to bližší než s ostatními zástupci řádu veslonozí. Fregatky byly na základě výsledků DNA-DNA hybridizace zařazeny do skupiny s řádem trubkonosí a kormoránovití, terejovití a anhingovití vytvořili samostatnou vývojovou větev. Faetoni byli postaveni úplně mimo ostatní skupiny (viz Obr. č. 2). Tato práce však bývá často kritizována kvůli chybám v metodickém přístupu (Ericson *et al.*, 2006).

Obr. č. 2: Fylogenetické vztahy řádu veslonohých podle Sibley *et Ahlquist* (1990)



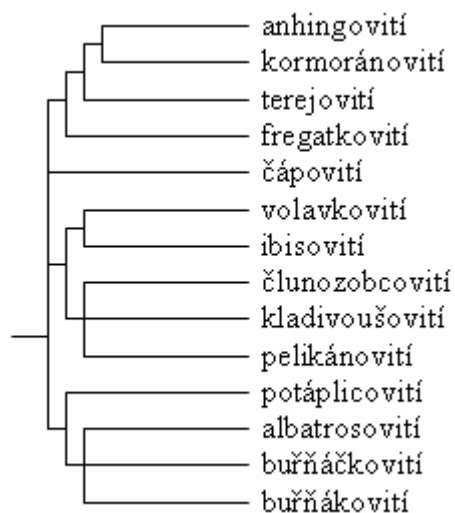
Hedges *et Sibley* (1994) analyzovali mitochondriální geny pro 12S rRNA a 16S rRNA u celkem 16 druhů ptáků z různých řádů a čeledí. Výsledky ukázaly podobné údaje jako DNA-DNA hybridizace, tedy že pelikánovití jsou nejbližší příbuzní člunozobci africkému a že kormoránovití a terejovití jsou samostatnou vývojovou větví. Rozdíl byl naopak v tom, že čeleď fregatkovitých vytvořila společnou vývojovou větev s kondory a faetoni byli zařazeni do společné skupiny s kormorány a tereji. Výsledky jsou uvedeny na obr. č. 3.

Obr. č. 3: Fylogenetické vztahy řádu veslonohých podle Hedges *et Sibley* (1994)



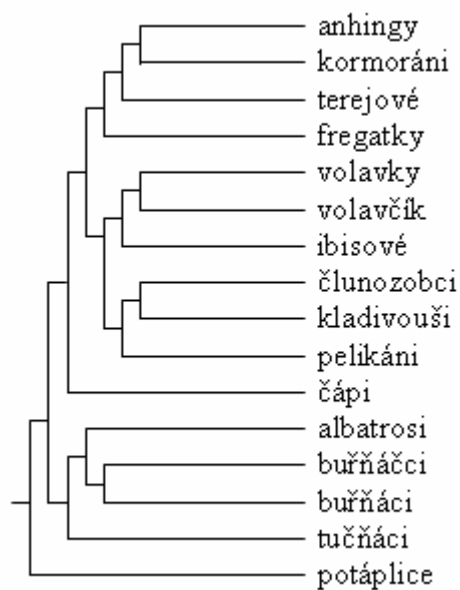
Ericson *et al.* (2006) provedli analýzu DNA získané od 87 ptačích druhů spadajících do 75 skupin. Na základě sekvenčních dat pěti jaderných genů a Bayesiánské analýzy prohlásili za monofyletickou skupinu fregatkovité, kormoránovitě, anhingovitě a terejovitě. Faetonovití pak byli postaveni zcela mimo ostatní veslonohé a pelikánovití do skupiny společně s člunozobci a kladivouši (viz obr. č. 4).

Obr. č. 4: Fylogenetické vztahy řádu veslonohých podle Ericson *et al.* (2006)



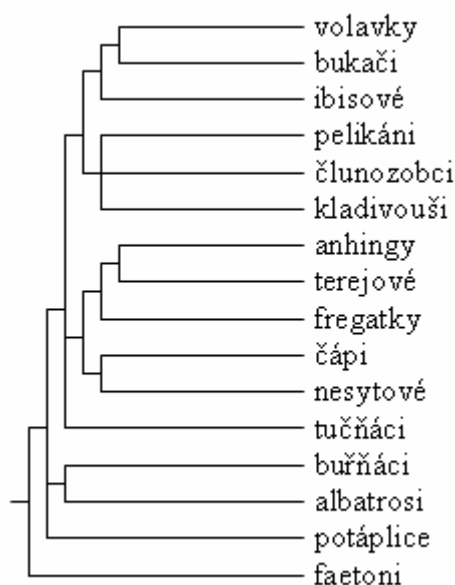
Hackett *et al.* (2008) využili pro studium evolučních vztahů skupiny Neoaves 32 kb dlouhou sekvenci z celkem 19 lokusů nukleární DNA. Z výsledků *alignmentu* uvedených na obr. č. 5 odvodili příbuznost mezi řádem veslonohých a brodivých, mezi jejichž zástupci došlo k promíchání v rámci jedné fylogenetické větve. Nejbližšími příbuznými těchto dvou řádů jsou pak trubkonosí. I tato práce potvrdila na základě molekulárně biologických dat příbuznost čeledi pelikánovitých s člunozobci a kladivouši.

Obr. č. 5: Fylogenetické vztahy řádu veslonohých podle Hackett *et al.* (2008).



Paško *et al.* (2011) osekvenovali části tří evolučně nezávislých genů (gen pro 28S rDNA, ornithin dekarboxylázu a β -fibrinogen), a to u 47 druhů z 29 rodin náležejících do skupiny létavých ptáků (Neognathae). Z těchto sekvencí odvodili fylogenetické vztahy v rámci testovaných druhů. Výsledky analýzy (viz obr. č. 6) jsou podobné jako výsledky předchozích studií založených na molekulárních datech, hlavně příbuznost pelikánů s člunozobci a kladivouši a monofyletičnost větve terejovitých a anhingovitých. Fregatkovití jsou v kladogramu postaveni jako samostatná skupina a faetonovití spadají do skupiny Metaves, narozdíl od ostatních čeledí náležejících mezi Neoaves.

Obr. č. 6: Fylogenetické vztahy řádu veslonohých podle Paško *et al.* (2011).



Fylogenetické vztahy v rámci řádu veslonozí zůstávají dosud neobjasněné, na základě molekulárně biologických dat je lze však prohlásit za polyfyletickou skupinu, s blízkou příbuzností pelikánů k člunozobci a kladivouši. Zároveň pak lze říci, že nejbližšími příbuznými veslonohých jsou řády trubkonosí a brodiví.

3.2 Čeleď pelikánovití

Čeleď pelikánovití je zastoupena jediným rodem pelikán (*Pelecanus*) se sedmi až osmi druhy (Brown *et al.*, 1982, Howard *et Moore*, 1994). Jako osmý druh býval někdy zmiňován pelikán růžový (*P. roseus*) vyskytující se v jihovýchodní Asii. Tento druh je však v současnosti slučován s pelikánem bílým (*P. onocrotalus*), u něhož byla zaznamenána velká variabilita zbarvení i velikosti na jednotlivých lokalitách (del Hoyo *et al.*, 1992). Od roku 2007 je uváděn jako samostatný druh pelikán chilský (*P. thagus*) žijící v oblasti Chile a Peru, dříve řazený jako poddruh pelikána hnědého (*P. occidentalis*) (Anonymous, 2012a).

Podle způsobu získávání potravy a hnízdního stanoviště lze poměrně snadno rozdělit tuto čeleď do tří skupin (del Hoyo *et al.*, 1992). První skupinu tvoří pelikán bílý, pelikán kadeřavý (*P. crispus*), pelikán australský (*P. conspicillatus*) a pelikán severoamerický (*P. erythrorhynchos*). Tyto čtyři druhy preferují lov ve skupinách a hnízdí na zemi zpravidla ve velkých hejnech. Do druhé skupiny náleží pelikán africký (*P. rufescens*) a pelikán skvrnozobý (*P. philippensis*), kteří hnízdí na stromech a loví

soliterně. Do poslední skupiny pak patří pelikán hnědý a pelikán chilský jakožto jediné druhy pelikánů, které se při lovu potápějí. Na základě molekulárně biologické analýzy mitochondriálních jaderných genů byli pelikáni rozděleni rovněž do tří skupin (Kennedy *et al.*, 2013). První skupinu tvoří pelikáni tzv. Starého světa, kam patří pelikán skvrnozobý, kadeřavý, africký a australský. Do další skupiny spadá pelikán hnědý, chilský a severoamerický. Samostatnou fylogenetickou větev pak tvoří pelikán bílý, se slabou vazbou na skupinu pelikánů Starého světa.

Morfologicky se jedná o mohutné ptáky patřící mezi jedny z nejtěžších létavých ptáků (del Hoyo *et al.*, 1992). Největším z pelikánovitých je pelikán kadeřavý s délkou těla až 180 cm, rozpětím křídel 345 cm a váhou přibližně 13 kg. Nejmenším pelikánem je naopak pelikán hnědý mající maximálně 114 cm na délku, s rozpětím křídel 200 cm a hmotností okolo 4 kg. Samci bývají většinou větší než samice, mladší jedinci jsou obvykle těžší. Pravděpodobně nejcharakterističtějším znakem pelikánů je jejich ostře zakončený dlouhý zobák dosahující délky až 47 cm u pelikána bílého. Dolní čelist je vysoce roztažitelná s obrovským kožním vakem schopným pojmout téměř 14 litrů vody. Křídla pelikánů jsou rovná a dlouhá. Opeření je zpravidla bílé, někdy se šedými nebo růžovými oblastmi, často s černými či tmavými letkami. Výjimkou je pelikán hnědý mající hnědé peří a světlejší krk, jeho zbarvení se však mění v závislosti na ročním období.

Výskyt zástupců této čeledi je omezen na pobřežní oblasti s mělkou vodou kvůli dostatku potravy (del Hoyo *et al.*, 1992). Většina druhů preferuje sladkovodní plochy, mohou být však viděni i u lagun a zátok, pelikán hnědý je pak jediným výhradně mořským druhem. Jejich potravou jsou ryby, i když pelikán hnědý nepohrdne ani zbytky a mršinami z okolí rybářských lodí (Schreiber, 1994). Většinou se jedná o společenské ptáky, a to během lovu, hnízdění i letu, s výjimkou pelikána skvrnozobého a afrického, kteří loví soliterně. Lov zabírá zpravidla minimum času, více než 21 hodin denně tráví pelikáni odpočinkem a péčí o peří (del Hoyo, 1992).

Let je pro pelikány obtížnou činností díky jejich poměrně velké tělesné hmotnosti (del Hoyo *et al.*, 1992). Při vzletu z vodní hladiny se odrážejí dolními končetinami za současného rychlého mávání křídlů. Pro delší trasy jsou pelikáni v tropických oblastech nuceni využívat teplých vzdušných proudů vyskytujících se ve dne kolem pobřeží, díky nimž jsou schopni cestovat i 24 hodin bez přestávky a urazit vzdálenost až 500 km denně. Maximální zjištěná rychlost letu pelikánů je 56 km/hod.

Pro hnízdění pelikánů musí být splněny dva základní předpoklady (del Hoyo *et al.*, 1992) – hnízdní lokalita musí být z dosahu pozemních predátorů a dostupnost dostatečného množství potravy pro celou hnízdní kolonii. Doba hnízdění je omezena také teplotou, evropské a severoamerické druhy pelikánů proto hnízdí jen od jara do září, kdežto tropické druhy celoročně. Pelikáni tvoří na hnízdištích rozsáhlé kolonie, kdy u druhů hnízdících na zemi byla zaznamenána hustota i 1 hnízdo/m². Kolonie bývají často smíšené s kormorány či se zástupci řádu brodivých. Pelikáni kladou zpravidla 1-6 vajec, na jejichž inkubaci se podílejí oba rodiče. Líhnutí mláďat nastává po 30-36 dnech, mláďata se líhnou holá a plně opeřená jsou po 10-12 týdnech. Krmení se účastní oba rodiče, výjimkou nebývá ani agresivita mezi sourozenci. V úspěšné kolonii připadá průměrně jedno odchované mládě na pár. Přestože dospělí pelikáni nejsou schopni vydávat zvuky, hnízdní kolonie bývají velice hlučné. Tento hluk bývá způsoben především hladovými mláďaty, částečně však také dospělými jedinci při ochraně jejich území či při svolávání mláďat.

Podle IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) byly na červenou listinu zapsány tři druhy pelikánů: pelikán skvrnozobý, hnědý a kadeřavý (Anonymous, 2012b). Z toho u pelikána skvrnozobého a kadeřavého byl zaznamenán pokles počtu volně žijících jedinců. Hlavním problémem, který pelikány ohrožuje, je bezpochyby lidská aktivita a rozšiřování zemědělských oblastí (del Hoyo *et al.*, 1992). Mnohá obvyklá hnízdiště pelikánů jsou také ohrožena kolísáním hladiny vody a jejich zaplavováním či vyrušováním ze strany turistů. Pro pelikány je tak stále složitější najít bezpečné a klidné hnízdiště. Severoamerické druhy byly znatelně postiženy působením DDT v 70. letech 20. století. Díky ochraně se však počty jedinců vracejí k původním hodnotám. V jižní Evropě jsou pelikáni výrazně ohroženi rybáři, kteří je obviňují ze snížení výnosu rybolovu, který je v této oblasti pro mnohé rybáře jediným způsobem obživy. V 90. letech bylo v Turecku zničeno několik kolonií pelikána kadeřavého přesto, že hlavním důvodem poklesu zisků z rybolovu byl nekontrolovaný lov. Ochrana pelikánů je tedy v této době zaměřena hlavně na osvětu místních obyvatel a ochranu a obnovu hnízdišť zatížených lidskou činností.

Obr. č. 7: Pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*) vzlétající z hladiny jezera Puiu.

(Foto: Zdeněk Chmelař ©)



3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity, známé také jako SSRs (*Simple Sequence Repeats*) nebo STRs (*Short Tandem Repeats*), jsou tandemově repetitivní sekvence DNA o délce základní jednotky repetice 1-6 bp (Buschiazzo *et* Gemmell, 2006), respektive 1-9 bp (Bhargava *et* Fuentes, 2010).

SSR markery se vyskytují v kódujících i nekódujících oblastech genomu, a to u eukaryotních i prokaryotních organismů (Tóth *et al.*, 2000). Mohou vznikat záměnou nukleotidu či insercí/delecí několika bp (*de novo* mikrosatelity) nebo aktivitou mobilních elementů (tzv. adoptované mikrosatelity) (Buschiazzo *et* Gemmell, 2006). Při obou těchto procesech vzniká nejprve protomikrosatelit o délce 3-4 jednotek repetice a tato sekvence je následně prodlužována či zkracována během replikace sklouznutím DNA polymerázy či rekombinací. Tím vzniká vysoký stupeň polymorfizmu typický pro mikrosatelitové lokusy, který je jejich hlavní výhodou.

Kromě velkého počtu alel patří mezi výhody SSRs snadný postup analýzy, její relativně nízká finanční náročnost a jednoduchá reprodukovatelnost mezi laboratořemi (Bhargava *et* Fuentes, 2010). Kombinace těchto vlastností dělá z mikrosatelitů hojně využívané markery nejen v populační genetice, ale také v medicínských výzkumech a při forenzních analýzách.

3.3.1 Hledání mikrosatelitových lokusů

Postup izolace mikrosatelitů *de novo* je obvykle založen na konstrukci parciální genomické knihovny, jejím *screeningu* hybridizací se sondami obsahujícími repetice, sekvenování pozitivních klonů, syntéze specifických primerů a optimalizaci podmínek PCR (Zane *et al.*, 2002).

Tento postup práce je však časově náročný a získá se při něm jen malý podíl mikrosatelitových lokusů, a to přibližně 0,04-12 % pozitivních klonů (Zane *et al.*, 2002). Proto jsou kvůli usnadnění práce i zvýšení efektivity vymyšleny alternativní metody. Ty mohou být založeny na PCR amplifikaci s náhodně zvolenými primery (RAPD primery) a následné hybridizaci PCR produktů se sondami obsahujícími mikrosatelitové repetice nebo na konstrukci primární knihovny s ssDNA a syntéze dsDNA se specifickými primery. I tyto alternativní přístupy však mají své nevýhody, ať stále relativně nízkou výtěžnost, či obtížný postup u druhů s malým obsahem repetitivních sekvencí v genomu, kam se řadí i ptáci (Primmer *et al.*, 1997). Z těchto důvodů se často přistupuje ke *cross-species* PCR amplifikaci.

Cross-species PCR amplifikace je metoda hledání mikrosatelitových lokusů s pomocí primerů, které byly již v minulosti odvozeny od jiných příbuzných druhů (Primmer *et al.*, 1996). Pravděpodobnost úspěšné PCR amplifikace přitom stoupá s klesající fylogenetickou vzdáleností zdrojového a testovaného druhu (Primmer *et al.*, 2005). Dalšími faktory ovlivňujícími úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace jsou celková délka mikrosatelitu u zdrojového druhu a teplota *annealingu*, kdy vyšší úspěšnost amplifikace byla zaznamenána u delších mikrosatelitových repetic a při snížení teploty *annealingu*.

3.3.2 Analýza mikrosatelitů

Tradičně je postup analýzy mikrosatelitových lokusů založen na PCR reakci s použitím specifických primerů a následné elektroforetické separaci. V posledních letech je přitom kladen důraz na vývoj postupů kombinujících multiplex PCR a následnou detekci pomocí kapilární elektroforézy, jejichž cílem je snížení finančních nákladů a časové náročnosti analýzy mikrosatelitových lokusů (Guichoux *et al.*, 2011).

Využití multiplex PCR při analýze SSR lokusů je podmíněno několika faktory, a to při navrhování multiplex PCR, tak i v jejím průběhu (Guichoux *et al.*, 2011). Při použití stejného fluorescenčního značení je nezbytné, aby primery použité pro

amplifikaci produkovaly rozdílně dlouhé amplikony. Zároveň pak všechny tyto primery musí mít stejnou teplotu *annealingu*, čehož je možné dosáhnout přidáním několika nukleotidů k sekvenci primerů a tím dojde k přiblížení procentuálnímu zastoupení GC k 50 %. K PCR amplifikaci musí být také zvoleny takové mikrosatelitové lokusy mající minimální výskyt *stutter bandů*, nulových alel či tzv. *split peaks* způsobených nerovnoměrným přidáváním jednoho nukleotidu (zpravidla adeninu) ke 3` konci PCR produktu *Taq* DNA polymerázou.

Důležitou roli při multiplex PCR hraje koncentrace templátové DNA (Guichoux *et al.*, 2011). Malé množství templátu může vyústit ve slabou PCR amplifikaci nebo v přednostní amplifikaci jedné alely (tzv. *allele dropout*), příliš velké množství templátové DNA naopak vede ke zvýšené tvorbě *stutter bandů*, neúplné adenylaci PCR produktů a příliš vysokému fluorescenčnímu signálu, který se tak stává neměřitelným. Během multiplex PCR se mohou také objevit problémy s nerovnoměrnou amplifikací testovaných mikrosatelitových lokusů, které mohou být odstraněny zvýšením koncentrace primerů u méně amplifikovaných lokusů či naopak snížením koncentrace primerů u nejsilnějších lokusů.

3.4 Mikrosatelity u pelikánovitých

V rámci čeledi pelikánovitých byly doposud hledány mikrosatelitové markery *de novo* pouze u dvou druhů, a to u pelikána severoamerického a u pelikána bílého. Daleko důkladnější studie pak byly u pelikánovitých provedeny s využitím *cross-species* PCR amplifikace s mikrosatelitovými primery odvozenými od blízce příbuzných druhů.

3.4.1 Mikrosatelitové lokusy odvozené *de novo*

Hickman *et al.* (2008) našli u pelikána severoamerického celkem 9 mikrosatelitových lokusů a navrhli pro tyto lokusy PCR primery. Následně provedli *screening* a optimalizaci podmínek PCR amplifikace u 23 jedinců tohoto druhu, u kterých našli 2 až 8 alel na lokus a pozorovaná heterozygotnost se pohybovala v rozmezí 0,217-0,957.

De Ponte Machado *et al.* (2009) publikovali 10 mikrosatelitových lokusů odvozených od pelikána bílého. Po navržení primerů byly tyto lokusy charakterizovány s pomocí DNA 23 jedinců náležejících do dvou různých populací. V rámci této skupiny

se počet alel pohyboval v rozmezí 2-19 alel na lokus a pozorovaná heterozygotnost dosahovala hodnot 0,261-0,913. Dva z nalezených lokusů přitom neodpovídaly Hardy-Weinbergovu zákonu, ovšem v obou případech se tato odchylka týkala pouze jedné ze dvou studovaných populací.

3.4.2 *Cross-species* PCR amplifikace

De Ponte Machado *et al.* (2009) po odvození 10 mikrosatelitových lokusů od pelikána bílého otestovali navržené páry primerů u dalších tří druhů pelikánů – u dvou jedinců pelikána severoamerického, pěti jedinců pelikána hnědého a u jednoho jedince pelikána afrického. Kromě lokusů PEL086 a PEL185 u pelikána afrického, které se neamplifikovaly, poskytovaly všechny mikrosatelitové páry primerů produkty s 1-7 alelami na lokus.

Reudink *et al.* (2011) využili ke zkoumání genetické struktury populace a genového toku u pelikána severoamerického 10 mikrosatelitových lokusů. Jednalo se o 7 lokusů (PeEr01, PeEr02, PeEr03, PeEr04, PeEr06, PeEr08 a PeEr09) původně izolované přímo z DNA pelikána severoamerického (Hickman *et al.*, 2008) a o 3 lokusy (PEL086, PEL149 a PEL304) odvozené od pelikána bílého (de Ponte Machado *et al.*, 2009). Studie probíhala na 333 jedincích z celkem 19 kolonií, počet alel se pohyboval v případě mikrosatelitů odvozených od pelikána severoamerického v rozmezí 4-13 alel na lokus, u lokusů odvozených od pelikána bílého pak v rozmezí 7-19 alel na lokus.

Jeyasingham *et al.* (2013) publikovali výzkum zaměřený na studium genového toku u pelikána chilského. Pro účely své práce využili kromě 838 bp dlouhého segmentu mitochondriální DNA také 7 párů primerů izolovaných ve dvou případech z DNA pelikána bílého (PEL149 a PEL185) a ve zbývajících pěti od pelikána severoamerického (PeEr02, PeEr03, PeEr05, PeEr07 a PeEr09). U 83 jedinců našli v průměru 12 alel na lokus, rozmezí alel pak bylo 4 až 26 alel na lokus. U lokusu PeEr05 pak autoři uvádějí vysokou pravděpodobnost výskytu nulových alel.

Poměrně rozsáhlé studie založené na mezidruhové PCR amplifikaci pak byly zpracovány v rámci bakalářských a diplomových prací v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Mikrosatelitové lokusy pro tyto práce byly vybírány na základě vyšší

úspěšnosti PCR amplifikace u lokusů odvozených od blízce příbuzných druhů ptáků (Primmer *et al.*, 2005).

Ranochová (2008) se ve své diplomové práci zaměřila na identifikaci polymorfních mikrosatelitových lokusů u tří druhů pelikánů: pelikána afrického, kadeřavého a bílého. K tomuto účelu využila celkem 62 párů primerů získaných od příbuzných druhů ptáků – 6 od kolpíka růžového (*Ajaja ajaja*), 17 od volavky velké (*Ardea herodias*), 10 od ibise rudého (*Eudocimus ruber*), 7 lokusů odvozených od kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), 7 od potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*) a 15 od nesyta lesního (*Mycteria americana*). Z těchto 62 mikrosatelitových lokusů byly u sedmi jedinců pelikána afrického polymorfní 4 lokusy se 2-6 alelami na lokus (Ah536, PcT1, Eru03 a Wsm20), u šesti jedinců pelikána kadeřavého 2 lokusy se 4, resp. 2 alelami (Ah536 a Wsm20) a u pěti jedinců pelikána bílého 7 lokusů se 2-5 alelami na lokus (Ah210, Ah211, Ah536, Ah630, Eru03, PcT1 a Wsm20). U pelikána bílého autorka navíc otestovala dalších 35 párů primerů odvozených od zástupců řádu pěvců, z nichž dva páry primerů neposkytovaly žádný produkt a všechny ostatní lokusy byly označeny za monomorfní.

Mikulová (2008) v rámci své bakalářské práce hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy u pelikána skvrnozobého. K tomuto účelu použila celkem 70 párů primerů odvozených z DNA zástupců čeledí volavkovitých (Ardeidae), čápoovitých (Ciconiidae), kormoránovitých, potápkovitých (Podicipedidae) a ibisovitých (Threskiornithidae), které otestovala na šesti nepříbuzných jedincích zkoumaného druhu. Nalezla celkem 5 polymorfních lokusů (Ah536, Ah630, Eru09, PcT1 a PhB11) se 2-4 alelami na lokus.

Dvořáková (2010) zacílila svou bakalářskou práci na nalezení polymorfních mikrosatelitů u pelikána afrického, které by bylo možno využít k testování paternity. K tomu použila 221 párů primerů odvozených od zástupců řádů veslonozí, brodiví, plameňáci (Phoenicopteriformes), potáplice (Gaviiformes), vrubozobí (Anseriformes), dlouhokřídlí (Charadriiformes) a tučnáci (Sphenisciformes). Z testovaných párů primerů poskytlo celkem 27 párů polymorfní produkt s rozmezím 2-5 alel na lokus.

Souběžně s předchozí prací probíhala také bakalářská práce zaměřená na hledání polymorfních lokusů u pelikána kadeřavého (Chmelařová, 2010). Z celkových 223 testovaných párů primerů použitých ke *cross-species* PCR amplifikaci bylo 11 polymorfních s průměrným počtem alel 2,64 na lokus, které vytvořily sestavu markerů využitelných ke studiím paternity a struktury populací pelikána kadeřavého.

Diplomová práce Veroniky Mikulové (2010) testovala na DNA pelikána skvrnozobého, bílého, afrického a kadeřavého 58 párů primerů odvozených od pelikánovitých, ibisovitých, kormoránovitých a od zebu indického (*Bos indicus*), u pelikána skvrnozobého a bílého pak dalších 126 párů primerů izolovaných z DNA ptáků ze skupiny dlouhokřídlých, tučňákovitých, terejovitých, fregatkovitých, čápoovitých, ibisovitých, plameňákovitých, potáplicovitých a volavkovitých a u pelikána bílého také 13 párů primerů odvozených od zástupců řádu veslonozí. U pelikána afrického a kadeřavého pak autorka našla shodně 9 polymorfních lokusů a u pelikána bílého celkem 49 polymorfních lokusů. U pelikána skvrnozobého pak objevila 31 polymorfních mikrosatelitů (viz Tab. č. 1), u kterých byly zjištěny alelové konstituce u 6 dospělců a jejich 11 mláďat a vypočítány charakteristiky pro nalezené lokusy. Na základě výsledků pak ověřila paternitu v rámci zmíněné chovné skupiny 17 jedinců pelikána skvrnozobého.

Tab. č. 1: Polymorfní mikrosatelitové lokusy nalezené u pelikána skvrnozobého v diplomové práci Mikulová (2010). Ve sloupcích tabulky je uvedena čeleď, zdrojový druh a název mikrosatelitového lokusu.

Čeleď	Zdrojový druh	MS
kormoránovití (Phalacrocoracidae)	kormorán galapážský (<i>Phalacrocorax harissi</i>)	PhB11
	kormorán ušatý (<i>P. auritus</i>)	COR 17, COR 41
pelikánovití (Pelecanidae)	pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	PEL149, PEL175, PEL190, PEL221, PEL304
	pelikán severoamerický (<i>P. erythrorhynchos</i>)	PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 08, PeEr 09
volavkovití (Ardeidae)	kvakoš noční (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	nycti26, nycti62
	volavka velká (<i>Ardea herodias</i>)	Ah 536, Ah 630
	volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)	Ae01, Ae30
ibisovití (Threskiornithidae)	kolpík malý (<i>Platalea minor</i>)	PM2-28, PM3-31
	ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Eru09
plameňákovití (Phaenicopteridae)	plameňák karibský (<i>Phoenicopiterus ruber</i>)	Pruμ4, Pruμ6
alkovití (Alcidae)	alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	Apy06
tučňákovití (Spheniscidae)	tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	AM13

Buržáková (2011) hledala během své bakalářské práce polymorfní mikrosatelity u pelikána bílého a pelikána skvrnozobého. Otestovala celkem 137 párů primerů odvozených od čeledí volavkovitých, čápoovitých, plameňákovitých, faetonovitých, kormoránovitých a terejovitých a od zástupců řádu vrubozobí u šesti jedinců obou zmíněných druhů, a našla tak 20 polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého a 9 lokusů u pelikána skvrnozobého. Z tohoto počtu byly celkem tři polymorfní produkty nehodnotitelné (1 u pelikána bílého a 2 u pelikána skvrnozobého) z důvodu velkého počtu *stutter* bandů. Počet alel se pohyboval v rozmezí 2-6 alel na lokus a pozorovaná heterozygotnost 0-0,83.

Nejnovější dokončenou prací s tímto zaměřením byla diplomová práce Anny Chmelařové z roku 2012. Autorka se zabývala hledáním a charakteristikou polymorfních mikrosatelitových markerů u chovné skupiny 41 jedinců pelikána kadeřavého a u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Celkem našla 51 polymorfních lokusů u pelikána afrického se 2-11 alelami na lokus a 24 polymorfních lokusů u pelikána kadeřavého s počtem alel v rozmezí 2-8 alel na lokus (seznam nalezených polymorfních lokusů je uveden v Tab. č. 2 a 3). U nalezených polymorfních lokusů stanovila alelové konstituce a následně tyto lokusy charakterizovala. Z hlediska úspěšnosti PCR amplifikace se u obou druhů nejlépe amplifikovaly primery odvozené od řádů veslonožců, brodivů a plameňáčů. U několika lokusů také autorka na základě genotypizační analýzy predikovala přítomnost nulových alel, a to u lokusů Ah 536, PEL185 a WSμ 20. Našla také 2 lokusy vázané na pohlaví (Eru03 a Sn2A-36). V závěru práce pak autorka ověřila příbuzenské vztahy v chovné skupině 41 jedinců pelikána kadeřavého ze ZOO Dvůr Králové nad Labem, a. s.

Tab. č. 2: Polymorfní mikrosatelitové lokusy nalezené u pelikána afrického v diplomové práci Chmelařová (2012). Ve sloupcích tabulky je uvedena čeleď, zdrojový druh a název mikrosatelitového lokusu.

Čeleď	Zdrojový druh	MS
faetonovití (Phaethontidae)	faeton žlutozobý (<i>Phaethon lepturus</i>)	P3F7
kormoránovití (Phalacrocoracidae)	kormorán velký (<i>Phalacrocorax aristotelis</i>)	Phaari09
	kormorán galapážský (<i>P. harissi</i>)	PhB11
	kormorán ušatý (<i>P. auritus</i>)	COR 17, COR 19, COR 26, COR 41, COR 47
fregatkovití (Fregatidae)	fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	Fmin13

Tab. č. 2: Pokračování.

Čeď	Zdrojový druh	MS
terejovití (Sulidae)	terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	Sn2A-36, Sn2B-83
	terej červenonohý (<i>S. sula</i>)	Ss1b-16, Ss1b-106, Ss2b-48
	terej guánový (<i>S. variagata</i>)	Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2B-27
pelikánovití (Pelecanidae)	pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	PEL149, PEL185, PEL190, PEL221, PEL265, PEL304
	pelikán severoamerický (<i>P. erythrorhynchos</i>)	PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 06, PeEr 08, PeEr 09
volavkovití (Ardeidae)	kvakoš noční (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	nycti26, nycti41, nycti62
	volavka velká (<i>Ardea herodias</i>)	Ah 536, Ah 630
	volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)	Ae26
	volavka červenavá (<i>E. rufescens</i>)	Er44
ibisovití (Threskiornithidae)	kolpík malý (<i>Platalea minor</i>)	PM2-28, PM3-31
	ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Eru03
	ibis čínský (<i>Nipponia nippon</i>)	Nn01, Nn04
čápvití (Ciconiidae)	čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)	CC9
čápvití (Ciconiidae)	nesyt lesní (<i>Mycteria americana</i>)	Wsu 20
plameňákovití (Phaenicopteridae)	plameňák růžový (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	PrA2, PrA110, PrB1, PrD7, PrD117
alkovití (Alcidae)	alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	Apy06
kachnovití (Anatidae)	kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APH12

Tab. č. 3: Polymorfnní mikrosatelitové lokusy nalezené u pelikána kadeřavého v diplomové práci Chmelařová (2012). Ve sloupcích tabulky je uvedena čeď, zdrojový druh a název mikrosatelitového lokusu.

Čeď	Zdrojový druh	MS
kormoránovití (Phalacrocoracidae)	kormorán ušatý (<i>P. auritus</i>)	COR 17, COR 41
		Dcco06
fregatkovití (Fregatidae)	fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	Fmin08, Fmin13, Fmin14
terejovití (Sulidae)	terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	Sn2A-36
pelikánovití (Pelecanidae)	pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	PEL185, PEL265, PEL304
	pelikán severoamerický (<i>P. erythrorhynchos</i>)	PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04
volavkovití (Ardeidae)	volavka velká (<i>Ardea herodias</i>)	Ah 536
	volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)	Ae42

Tab. č. 3: Pokračování.

Čeď	Zdrojový druh	MS
ibisovití (Threskiornithidae)	ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Eru03
	ibis čínský (<i>Nipponia nippon</i>)	Nn01, Nn04
čápvití (Ciconiidae)	čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)	CC9
čápvití (Ciconiidae)	nesyt lesní (<i>Mycteria americana</i>)	Wsu 20
plameňákovití (Phaenicopteridae)	plameňák růžový (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	PrA2, PrA110, PrD7
alkovití (Alcidae)	alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	Apy06

3.4.3 Nově objevené mikrosatelity potenciálně vhodné ke *cross-species* PCR amplifikaci u pelikánů

V průběhu této diplomové práce byly publikovány nově nalezené mikrosatelitové lokusy u dvou příbuzných druhů čeledi pelikánovitých.

U čápa východního (*Ciconia boyciana*) z řádu brodivých bylo nalezeno 8 mikrosatelitových lokusů (Wang *et al.*, 2011). Počet alel se pohyboval v rozmezí 2-8 alel na lokus u 23 jedinců zdrojového druhu a pozorovaná heterozygotnost dosahovala hodnot 0-0,857. Autoři uvádějí možnost využití sedmi z těchto lokusů v populačních studiích týkajících se čápa východního, s vyloučením lokusu Cbo235. U tohoto lokusu sice našli u daných 23 jedinců 2 alely, ovšem všichni jedinci byli pro tento lokus homozygotní (pozorovaná heterozygotnost byla nulová). Detekovali také vysokou pravděpodobnost výskytu nulových alel u dvou lokusů (Cbo133 a Cbo235).

Campanini *et al.* (2012) publikovali 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů izolovaných z DNA volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*). Počet alel byl 2-4 alely na lokus u 35 jedinců z jihovýchodní Brazílie. Pomocí programu Micro-Checker nebyly u žádného lokusu detekovány nulové alely. Autoři predikovali využití těchto lokusů při studiu struktury populace volavky rusohlavé jakožto invazního druhu na americkém kontinentu.

4 Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

Pro hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů a jejich charakterizaci u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) byly využity vzorky krve získané od 21 nepříbuzných jedinců, kteří pocházeli z pěti zoologických zahrad v České republice (ZOO Jihlava, ZOO Lešná, ZOO Liberec, ZOO Plzeň a ZOO Praha). U pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*) bylo ke stejnému účelu využito 17 jedinců tvořících chovnou skupinu ze ZOO Dvůr Králové nad Labem, která byla tvořena celkem šesti dospělými jedinci a jejich 11 mládřaty.

Od všech testovaných jedinců bylo odebráno 20-100 μ l krve z tarzální žíly a smícháno s 1 ml Queen's pufru. Takto odebrané vzorky byly uchovány v chladničce při 4 °C a použity k izolaci genomické DNA.

4.2 Izolace genomické DNA z ptačí krve

Postup byl převzat podle Maniatis *et al.* (1982) a upraven pro podmínky Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.

1. Napipetovat 500 μ l krve v Queen's pufru do mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml.
2. Přidat 100 μ l roztoku proteinázy K (10 mg/ml), překlápěním promíchat, připipetovat 100 μ l 10% roztoku SDS a za stálého překlápění inkubovat do následujícího dne v termostatu při 37 °C.
3. Po ukončení inkubace přidat ke směsi 300 μ l chloroformu a 300 μ l fenolu, zvortexovat a zcentrifugovat (2000 g, 2 min). Ustřiženou špičkou odebrat vrchní fázi do nové mikrozkuhavky.
4. K odebranému vzorku přidat 600 μ l chloroformu, zvortexovat a zcentrifugovat (2000 g, 2 min) a opět odebrat vrchní fázi ustřiženou špičkou. Tento krok zopakovat ještě jednou.
5. K odebranému vzorku připipetovat 150 μ l vychlazeného octanu sodného (3 mol/l) a mikrozkuhavky vyplnit izopropanolem. Promíchat překlápěním a uložit na minimálně 2 hodiny do -20 °C.

6. Mikroskopické vzorky zcentrifugovat (13000 g, 30 min). Opatrně slít izopropanol a napipetovat 1 ml vychlazeného 70% ethanolu.
7. Centrifugovat 15 minut při 13000 g/min.
8. Opatrně slít ethanol a obsah mikroskopické vzorky vysušit v termobloku (přibližně 1 hodinu při 55 °C).
9. Rozpuštit přes noc za neustálého překlápění v termostatu při 40 °C.
10. Po stanovení koncentrace DNA zamrazit v -20 °C, před opětovným použitím nutno opakovat krok 9.

4.3 Mikrosatelitové lokusy použité ke *cross-species* PCR amplifikaci u pelikána bílého a pelikána skvrnozobého

V rámci této diplomové práce byly použity mikrosatelitové primery, které byly již v minulosti u daného druhu polymorfní, dále pak primery, které byly polymorfní u pelikána kadeřavého (*P. crispus*) nebo pelikána afrického (*P. rufescens*). Všechny tyto mikrosatelitové lokusy byly vybrány na základě předchozích bakalářských či diplomových prací zpracovaných v rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP (Ranochová, 2008; Buržáková, 2010; Mikulová, 2010; Chmelařová, 2012). Dále byly použity primery, které byly odvozeny *de novo* od příbuzných druhů ptáků v průběhu této diplomové práce a u pelikánů prozatím nebyly testovány. Všechny páry primerů použité ke *cross-species* PCR amplifikaci u pelikána bílého a skvrnozobého jsou uvedeny v Tab. č. 4 a 5.

Tab. č. 4: Mikrosatelitové lokusy testované u pelikána bílého. Ve sloupcích tabulky je uvedena vždy čeleď, původní zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu a zdrojová publikace.

Čeleď	Zdrojový druh	MS	Literární zdroj
faetonovití (Phaetontidae)	faeton žlutozobý (<i>Phaethon lepturus</i>)	P3F7, P3G12	Humeau <i>et al.</i> , 2010
kormoránovití (Phalacrocoracidae)	kormorán velký (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	PcT 1	Piertney <i>et al.</i> , 1998
	kormorán chocholatý (<i>P. aristotelis</i>)	Phaari03, Phaari16	Barlow <i>et al.</i> , 2010
		Phaari04, Phaari09	Barlow, osobní sdělení
	kormorán galapážský (<i>P. harissi</i>)	PhB2, PhB11	Duffie <i>et al.</i> , 2008

Tab. č. 4: Pokračování 1.

Čeď	Zdrojový druh	MS	Autor
kormoránovití (Phalacrocoracidae)	kormorán ušatý (<i>P. auritus</i>)	COR 03, COR 15, COR 17, COR 19, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 41, COR 47	Fike <i>et al.</i> , 2009
		Dcco06	Mercer <i>et al.</i> , 2010
fregatkovití (Fregatidae)	fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	Fmin08, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin16	Dearborn <i>et al.</i> , 2008
terejovití (Sulidae)	terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	BOOB-RM4-C03	Faircloth <i>et al.</i> , 2009
	terej červenonohý (<i>S. sula</i>)	Sn2A-36, Sn2B-83, Sn2B-100	Taylor <i>et al.</i> , 2010
	terej guánový (<i>S. variagata</i>)	Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2B-27	Taylor <i>et al.</i> , 2010
pelikánovití (Pelecanidae)	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>P. erythrorhynchos</i>)	PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 08, PeEr 09	Hickman <i>et al.</i> , 2008
volavkovití (Ardeidae)	kvakoš noční (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	nycti22, nycti26, nycti41, nycti62, nycti68	Chang <i>et al.</i> , 2009
	volavka velká (<i>Ardea herodias</i>)	Ah 210, Ah 211, Ah 536, Ah 630	McGuire <i>et Noor</i> , 2002
	volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)	Ae01, Ae26, Ae30, Ae42	Huang <i>et al.</i> , 2009
	volavka červenavá (<i>E. rufescens</i>)	Er21, Er44	Hill <i>et Green</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
ibisovití (Threskiornithidae)	kolpík růžový (<i>Ajaja ajaja</i>)	Aaju SEX	Sawyer, osobní sdělení
	kolpík malý (<i>Platalea minor</i>)	PM1-17, PM2-28, PM3-13, PM3-31	Yeung <i>et al.</i> , 2009
	ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Eru03, Eru09	Santos <i>et al.</i> , 2006
	ibis čínský (<i>Nipponia nippon</i>)	Nn01, Nn04, Nn21 NnEB12	He <i>et al.</i> , 2006 Ji <i>et al.</i> , 2004
čápvití (Ciconiidae)	čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)	Cc01, Cc05, Cc07 CC1, CC3, CC9	Shephard <i>et al.</i> , 2009 Segelbacher, osobní sdělení
	čáp východní (<i>C. boyciana</i>)	Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168, Cbo235	Wang <i>et al.</i> , 2011

Tab. č. 4: Pokračování 2.

Čeď	Zdrojový druh	MS	Autor
čápvití (Ciconiidae)	nesyt lesní (<i>Mycteria americana</i>)	Wsu 20	Tomasulo- Seccomandi <i>et al.</i> , 2003
plameňákovití (Phaenicopteridae)	plameňák růžový (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	PrA2, PrA110, PrB1, PrD7, PrD117, PrD139	Geraci <i>et al.</i> , 2010
	plameňák karibský (<i>P. ruber</i>)	Pruμ1, Pruμ4, Pruμ5, Pruμ6	Kapil <i>et al.</i> , 2005
alkovití (Alcidae)	alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	Apy06	Dawson <i>et al.</i> , 2005
kachnovití (Anatidae)	kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APH12	Maak <i>et al.</i> , 2003
tučňákovití (Spheniscidae)	tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	AM13	Roeder <i>et al.</i> , 2001

Tab. č. 5: Mikrosatelitové lokusy testované u pelikána skvrnozobého. Ve sloupcích tabulky je uvedena vždy čeď, původní zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu a zdrojová publikace.

Čeď	Zdrojový druh	MS	Autor
faetonovití (Phaetontidae)	faeton žlutozobý (<i>Phaethon lepturus</i>)	P3F7, P3G12	Humeau <i>et al.</i> , 2010
kormoránovití (Phalacrocoracidae)	kormorán velký (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	PcT 1	Piertney <i>et al.</i> , 1998
	kormorán chocholatý (<i>P. aristotelis</i>)	Phaari03, Phaari16	Barlow <i>et al.</i> , 2010
		Phaari04, Phaari09	Barlow, osobní sdělení
	kormorán galapážský (<i>P. harissi</i>)	PhB2	Duffie <i>et al.</i> , 2008
	kormorán ušatý (<i>P. auritus</i>)	COR 03, COR 15, COR 19, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 47	Fike <i>et al.</i> , 2009
Dcco06		Mercer <i>et al.</i> , 2010	
fregatkovití (Fregatidae)	fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	Fmin16	Dearborn <i>et al.</i> , 2008
terejovití (Sulidae)	terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	BOOB-RM4-C03	Faircloth <i>et al.</i> , 2009
		Sn2A-36, Sn2B-83, Sn2B-100	Taylor <i>et al.</i> , 2010
	terej červenonohý (<i>S. sula</i>)	Ss1b-16, Ss1b-98, Ss1b-106, Ss2b-153	Morris-Pocock <i>et al.</i> , 2010
terej guánový (<i>S. variagata</i>)	Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2B-27	Taylor <i>et al.</i> , 2010	
pelikánovití (Pelecanidae)	pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	PEL086, PEL185, PEL188, PEL207, PEL265	de Ponte Machado <i>et al.</i> , 2009
	pelikán severoamerický (<i>P. erythrorhynchos</i>)	PeEr 01	Hickman <i>et al.</i> , 2008
volavkovití (Ardeidae)	kvakoš noční (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	nycti22, nycti41, nycti68	Chang <i>et al.</i> , 2009
	volavka velká (<i>Ardea herodias</i>)	Ah 210	McGuire <i>et Noor</i> , 2002
	volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)	Ae26, Ae42	Huang <i>et al.</i> , 2009

Tab. č. 5: Pokračování.

Čeleď	Zdrojový druh	MS	Autor
volavkovití (Ardeidae)	volavka červenavá (<i>E. rufescens</i>)	Er21, Er44	Hill <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
ibisovití (Threskiornithidae)	kolpík růžový (<i>Ajaja ajaja</i>)	Aaju SEX	Sawyer, osobní sdělení
	kolpík malý (<i>Platalea minor</i>)	PM1-17, PM3-13	Yeung <i>et al.</i> , 2009
	ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Eru03	Santos <i>et al.</i> , 2006
	ibis čínský (<i>Nipponia nippon</i>)	Nn01, Nn04	He <i>et al.</i> , 2006
		NnEB12	Ji <i>et al.</i> , 2004
nesyt lesní (<i>Mycteria americana</i>)	Wsu 20	Tomasulo- Seccomandi <i>et al.</i> , 2003	
čápvití (Ciconiidae)	čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)	Cc01, Cc05, Cc07	Shephard <i>et al.</i> , 2009
		CC1, CC3, CC9	Segelbacher, osobní sdělení
	čáp východní (<i>C. boyciana</i>)	Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168, Cbo235	Wang <i>et al.</i> , 2011
plameňákovití (Phaenicopteridae)	plameňák růžový (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	PrA2, PrA110, PrB1, PrD7, PrD117, PrD139	Geraci <i>et al.</i> , 2010
	plameňák karibský (<i>P. ruber</i>)	Pruμ1, Pruμ5	Kapil <i>et al.</i> , 2005
kachnovití (Anatidae)	kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APH12	Maak <i>et al.</i> , 2003

4.4 PCR

Všechny složky PCR směsi rozmrazit, zvortexovat, zcentrifugovat a napipetovat do 1,5ml mikrozkušavky podle následujícího rozpisu (podle potřeby přepočítat na počet testovaných vzorků):

Složení PCR směsi pro 6 vzorků:

deionizovaná voda	42,50 μl
reaction buffer A 10x	6,30 μl
MgCl ₂ [25 mmol/l]	3,75 μl
dNTPs [20 μmol/l]	0,65 μl
primer R [10 μmol/l]	3,10 μl
primer F [10 μmol/l]	3,10 μl
aTaq DNA polymeráza [5 U/μl]	1,00 μl

Do PCR zkumavek napipetovat 1 μ l DNA o koncentraci 5-25 ng/ μ l a do každé pak připipetovat 9 μ l PCR směsi. PCR zkumavky zvortexovat, zcentrifugovat a vložit do termocykléru naprogramovaného podle schématu:

Časový a teplotní profil PCR reakce

5 min.....	94 °C	} 35 x
30 s.....	94 °C	
30 s.....	teplota <i>annealingu</i> (viz Tab. č. 6 a 7)	
30 s.....	72 °C	
5 min.....	72 °C	

4.5 Postup analýzy PCR produktů

Tento postup byl optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra.

Příprava 6% polyakrylamidového gelu

1. Větší sklo omýt destilovanou vodou, osušit papírovým ručníkem a 1krát přetřít 96% ethanolem. Ošetřit přípravkem na odpuzování vody ze skel automobilů a 1krát přetřít deionizovanou vodou.
2. Menší sklo umýt detergentem a deionizovanou vodou, osušit papírovým ručníkem a 1krát přetřít 96% ethanolem. Do mikrozkušavky napipetovat 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu a 3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu, protřepat a aplikovat na sklo. Důkladně rozetřít, nechat schnout 5 minut a poté 4krát přetřít 96% ethanolem.
3. Na okraje většího skla položit spacers, na ně položit menší sklo a obě skla k sobě připevnit klipsy.
4. V kádince připravit 6% polyakrylamidový gel smícháním 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu, 400 μ l 10% peroxodisíranu amonného (APS) a 40 μ l N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu (TEMED). Gel promíchat a nalít mezi skla. Do mezery mezi skly vložit hřebínek rovnou stranou a skla k sobě připevnit klipsy.
5. Gel nechat polymerovat minimálně 60 minut.

Elektroforetická separace PCR produktů

6. Po ztuhnutí gelu odstranit klipsy, skla důkladně umýt, osušit a vložit do elektroforetické komůrky menším sklem k hliníkové desce.
7. Katodový i anodový prostor zalít 0,5x TBE pufrem, vytáhnout hřebínek a vzniklý prostor mezi skly důkladně propláchnout pufrem pomocí stříkačky.
8. Připojit elektrody a nastavit zdroj stejnosměrného proudu na tyto limitní hodnoty: 150 mA, 3000 V a 90 W. Za těchto podmínek předehtřívát gel přibližně 30 minut.
9. Ke vzorkům přidat 5 μ l nanášecího pufru a denaturovat v termocykléru 3-5 minut při 94 °C. Po uplynutí doby ihned přemístit na led.
10. Odpojit elektrody a do mezery mezi skly vložit hřebínek tak, aby zoubky byly přibližně 1 mm v gelu. Do takto vzniklých jamek nanést 2 μ l vzorků.
11. Nastavit limitní hodnotu výkonu na 70 W a nechat vzorky separovat podle potřeby (1 až 4 hodiny).

Vizualizace elektroforetogramu

12. Po skončení separace PCR produktů odpustit pufr z katodového prostoru a skla na vodorovné ploše s pomocí nože oddělit od sebe.
13. Menší sklo s gelem přesunout do fotomisky a zalít fix/stop roztokem. Třepat na třepačce 20 minut, poté fix/stop roztok slít zpět do baňky a fotomisku s gelem 3krát promýt deionizovanou vodou.
14. Gel zalít 1% roztokem kyseliny dusičné, třepat 4-5 minut a poté 4krát promýt deionizovanou vodou.
15. Gel přesunout do 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného s 1,2 ml formaldehydu a třepat 30 minut. Poté krátce opláchnout deionizovanou vodou.
16. Do vychlazeného 3% roztoku uhličitanu sodného přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l 1% roztoku thiosíranu sodného. Tento roztok nalít na gel a nechat protřepávat do doby než dojde k vizualizaci bandů. Poté reakci zastavit přilítím uschovaného fix/stop roztoku.
17. Gel přesunout do fotomisky s deionizovanou vodou a poté usušit v sušárně (přibližně 60 minut při 60 °C). Gel vyhodnotit na negatoskopu.
18. Po vyhodnocení gel vložit do roztoku hydroxidu sodného na několik desítek minut až hodin a poté sklo omýt detergentem a deionizovanou vodou.

4.6 Statistické zpracování experimentálních dat

Po odečtení alelových konstitucí z elektroforetogramu byla všechna získaná data vyhodnocena pomocí populačně-genetických statistických programů.

Prvním použitým programem byla verze programu Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007), s jehož pomocí byly nalezené polymorfní lokusy popsány následujícími charakteristikami: očekávaná a pozorovaná heterozygotnost, vypovídací hodnota mikrosatelitu, výskyt nulových alel a zda lokus odpovídá Hardy-Weinbergově rovnováze. Program také udává hodnoty spolehlivosti mikrosatelitových lokusů při analýze paternity a při populačních studiích. Pomocí webové verze programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008) pak bylo zjištěno, zda-li nejsou nalezené lokusy ve vazbě.

4.7 Vybavení laboratoře

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiquette – 0,5 až 10 μ l (osmikanálová) a 0,3 μ l až 1 ml (ThermoLabsystems)
- Mikropipety Nichpipet EX 0,5 μ l až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific Ltd)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)
- Termocyklér GenePro (BIOER technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér XP Thermal Cyclor (BIOER technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

4.8 Seznam použitých chemikálií

- 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 (Na₂EDTA) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Chloroform (Lachema)
- Izopropanol (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema)
- Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová – ledová (Lachema)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachhema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)
- N,N'-methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Proteináza K (10 mg/ml) (Sigma)
- Thiosíran sodný (Lachema)

- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.9 Seznam použitých roztoků

Dusičnan stříbrný (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 (1 mol/l, roztok)

- 40 g hydroxidu sodného
- doplnit deionizovanou vodou do 1 l

Kyselina dusičná (1% roztok)

- 800 ml deionizované vody
- 12 ml 65% kyseliny dusičné

Molekulární lepidlo

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

Nanášecí pufr

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

Peroxodisíran amonný (10% roztok)

1 g peroxodisíranu amonného

- rozpustit v 10 ml deionizované vody, uchovávat v chladničce

Polyakrylamidový 6% gel

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

40 μ l N, N, N', N'- tetramethylethyldiaminu

400 μ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

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 a doplnit deionizovanou vodou na 1 l

TBE pufr (zásobní roztok 10x)

108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)

55 g kyseliny borité H_3BO_3

40 ml roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0

- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Vývojka

800 ml deionizované vody

24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3

- vychladit na teplotu nižší než 10 °C

- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l 1% roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

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

380 g akrylamidu

20 g N,N'- methylenbisakrylamidu

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

Zásobní 6% roztok akrylamidu

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 v chladničce

[REDACTED]

AY268100		CGGGCCTTTATCTATC R:ACAGTACCAAACCATTCA											

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
DQ098108	[REDACTED]	[REDACTED]	F:GGGAAGAGCATTAAAAAGG R:AGCCTGGAAGTAGCATTGG	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

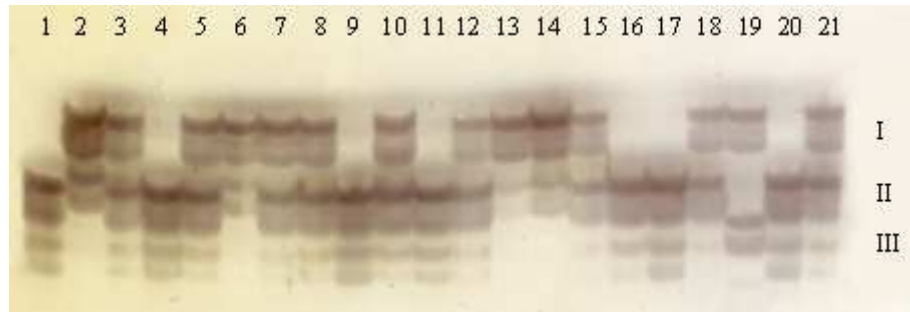
[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

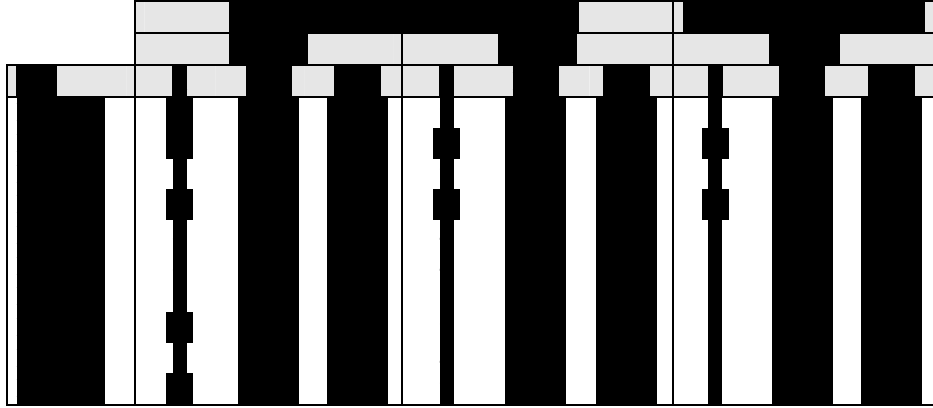
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Large redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

7 Závěr

V průběhu své diplomové práce jsem hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*) s pomocí *cross-species* PCR amplifikace s využitím primerů odvozených od příbuzných skupin ptáků.

V první fázi jsem testovala lokusy, které byly u daných druhů pelikánů prohlášeny za polymorfní v bakalářské práci Buržáková (2011) a v diplomových pracích Ranochová (2008) a Mikulová (2010). Dále jsem vybrala mikrosatelitové lokusy, které byly původně u mnou zkoumaných druhů pelikánů prohlášeny za monomorfní, poskytly však polymorfní produkt u některého z ostatních druhů pelikánů. Posledním krokem byla *cross-species* PCR amplifikace s využitím párů primerů odvozených *de novo* od čápa východního (*Ciconia boyciana*) a volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*), které byly publikovány v průběhu této diplomové práce a doposud u pelikánů nebyly testovány.

Nalezla jsem celkem 82 párů primerů amplifikujících 84 polymorfních lokusů u pelikána bílého a 18 polymorfních lokusů u pelikána skvrnozobého. Z 82 párů primerů poskytujících polymorfní produkt u pelikána bílého bylo 10 původně odvozeno od tohoto druhu a v rámci této práce jsem ověřila charakteristiky u 21 nepříbuzných jedinců a zjistila, že tyto lokusy nejsou ve vazbě s žádným z ostatních polymorfních lokusů charakterizovaných v průběhu této diplomové práce. Po provedení genotypizační analýzy u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého a chovné skupiny 17 jedinců pelikána skvrnozobého jsem všechny tyto lokusy charakterizovala pomocí programu Cervus a ověřila vazbu mezi lokusy s využitím webové verze programu Genepop. Na základě získaných charakteristik polymorfních mikrosatelitů jsem stanovila sadu 6 lokusů u pelikána bílého, respektive 7 lokusů u pelikána skvrnozobého, které by bylo možno využít k ověřování paternity u těchto druhů. Nalezla jsem také 3 lokusy vázané na pohlaví u pelikána bílého, z toho 2 lokusy vykazovaly vazbu na pohlaví i u pelikána skvrnozobého. Lokus Sn2A-36 je pak univerzálním pohlavním markerem u všech druhů pelikánů doposud zkoumaných v rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.

8 Seznam použitých zkratk

A	adenin
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	směs deoxyribonukleosid trifosfátů
H _{exp}	očekávaná heterozygotnost (<i>expected heterozygosity</i>)
H _{obs}	pozorovaná heterozygotnost (<i>observed heterozygosity</i>)
G	guanin
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIC	vypovídací hodnota mikrosatelitu (<i>polymorphism information content</i>)
SSRs	repetice jednoduchých sekvencí (<i>simple sequence repeats</i>)
STRs	krátké tandemové repetice (<i>short tandem repeats</i>)
T	thymin
T _a	teplota <i>annealingu</i>
t _s	čas separace v 6% polyakryamidovém gelu

9 Seznam použité literatury

- Anonymous (2012a): BirdLife International 2012. *Pelecanus thagus*. Navštíveno dne 29. 12. 2012 na www.birdlife.org.
- Anonymous (2012b): IUCN Red List of Threatened Species. Navštíveno dne 29. 12. 2012 na www.iucnredlist.org.
- Barlow EJ, Telford A, Daunt F, Cavers S (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*. In press.
- Bhargava A, Fuentes FF (2010): Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology* 44: 250-266.
- Buržáková K (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UPOL).
- Buschiazzo E, Gemmell NJ (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioAssays* 28: 1040-1050.
- Brown LH, Urban EK, Newman K (1982): The Birds of Africa. Vol. 1, 2nd edition. Academic Press Ltd., London.
- Campanini EB, Sanches A, Hatanaka T, Del Lama SN (2012): Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from cattle egret (*Bubulcus ibis*) and cross-amplification in other Ardeidae species. *Conservation Genetics Resources* 4: 707-709.
- 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.
- Chmelařová A (2010): Analýza polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UPOL).
- 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 UPOL).
- Cracraft J (1985): Monophyly and phylogenetic relationships of the Pelecaniformes: A numerical cladistic analysis. *The Auk* 102: 834-853.
- Dawson DA, Hunter FM, Pandhal J, Buckland R, Parham A, Jones IL, Bradshaw M, Jehle R, Burke T (2005): Assessment of 17 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5-15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes* 5: 289-297.
- de Ponte Machado M, Feldheim KA, Sellas AB, Bowie RCK (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics* 10: 1033-1036.
- del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.

- 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.
- Duffie C, Glenn TC, Hagen C, Parker P (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources* 8: 625-627.
- Dvořáková B (2010): Analýza polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UPOL).
- Ericson PGP, Anderson CL, Britton T, Elzanowski A, Johansson US, Källersjö M, Ohlson JI, Parsons TJ, Zuccon D, Mayr G (2006): Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters* 2: 543-547.
- Faircloth BC, Ramos A, Drummond H, Gowaty PA (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxii*). *Conservation Genetics Resources* 1: 159-162.
- Fike JA, Default TL, Rhodes OE (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* 9: 1183-1185.
- Geraci J, Gaillard M, Bechet A, Cezilly F, Wattier RA (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*. In press.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011): Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591-611.
- Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, Braun MJ, Chojnowski JL, Cox WA, Han K-L, Harshman J, Huddleston CJ, Marks BD, Miglia KJ, Moore WS, Sheldon FH, Steadman DW, Witt CC, Yuri T (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* 320: 1763-1768.
- He L-P, Wan Q-H, Fang S-G, Xi Y-M (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics* 7: 157-160.
- Hedges SB, Sibley CG (1994): Molecules vs. morphology in avian evolution: The case of the „pelecaniform“ birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 9861-9865.
- Hickman CR, Peters MB, Crawford NG, Hagen C, Glenn TC, Sommers CM (2008): 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.
- Howard R, Moore A (1994): A Complete Checklist of the Birds of the World. Academic Press Ltd, London.

- 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.
- Humple DL (2009): Genetic structure and demographic impacts of oil spills in Western and Clark's Grebes. Doktorská práce (Dep. In: Sonoma State University). Navštíveno dne 15. 4. 2013 na <http://hdl.handle.net/10211.1/805>.
- Humeau L, Da Silva D, Guérin F, Jaquemet S, Requier J-B, Le Corre M (2010): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Phaeton lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources*. In press.
- Jeyesingham WS, Taylor SA, Zavalaga CB, Simeone A, Friesen VL (2013): Specialization to cold-water upwellings may facilitate gene flow in seabirds: new evidence from the Peruvian pelican *Pelecanus thagus* (Pelecaniformes: Pelecanidae). *Journal of Avian Biology*. In press.
- Ji Y-J, Liu Y-D, Ding C-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.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007): Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16, 1099-1106.
- Kapil R, Sawyer GM, Preston L, Benjamin RC (2009): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*. In press.
- Kennedy M, Taylor SA, Nádvorník P, Spencer HG (2013): The phylogenetic relationships of the extant pelicans inferred from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 215-222.
- Maak S, Wimmers K, Weigend S, Neumann K (2003): Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 3: 224-227.
- 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 the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources* 2: 119-121.
- Mikulová V (2008): Studium paternity u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Mikulová V (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

- Morris-Pocock JA, Taylor SA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources*. In press.
- Paško Ł, Ericson PGP, Elzanowski A (2011): Phylogenetic utility and evolution of indels: A study in neognathous birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 760-771.
- Piertney SB, Goostrey A, Dallas JF, Carss DN (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology* 7: 133-140.
- Primmer CR, Møller AP, Ellegren H (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.
- Primmer CR, Raudsepp T, Chowdhary BP, Møller AP, Ellegren H (1997): Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research* 7: 471-482.
- Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merilä J (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36: 348-360.
- Ranochová A (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Riordan J, Gardner MG, Fitch AJ, Johnston GR (2012): Isolation, via 454 sequencing, and characterisation of microsatellites for *Phalacrocorax fuscescens*, the black-faced cormorant (Aves: Phalacrocoracidae). *Australian Journal of Zoology* 60: 340-342.
- Reudink MW, Kyle CJ, Nocera JJ, Oomen RA, Green MC, Somers CM (2011): Panmixia on a continental scale in a widely distributed colonial waterbird. *Biological Journal of the Linnean Society* 102: 583-592.
- Roeder AD, Marshall RK, Mitchelson AJ, Visagathilagar T, Ritchie PA, Love DR, Pakai TJ, McPartlan HC, Murray ND, Robinson NA, Kerry KR, Lambert DM (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology* 10: 1645-1656.
- Rousset F (2008): GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103-106.
- Santos MS, Goncalves EC, Barbosa MSR, Silva A, Schneider PC (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes* 6: 307-309.
- Sibley CG, Ahlquist JE (1990): Phylogeny and classification of birds: A study in molecular evolution. Yale University Press, New Haven.
- Schreiber EA (1994): Pelikáni a jejich příbuzní. In: Homolová Š (Ed.): Obratlovci: savci, ptáci, obojživelníci, plazi: encyklopedický průvodce světem zvířat, 1. vydání. Nakladatelský dům OP, Praha.
- 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.

- 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, Brisbin IL, 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.
- 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.
- Yeung CKL, Hsu Y-C, Yao C-T, Li S-H (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, Patarnello T (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

[REDACTED]