

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Alžběta Němečková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu
veslonozí a plameňáci u nesyta bílého
(*Mycteria cinerea*)**

Bakalářská práce

Alžběta Němečková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

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

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

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za odborné rady, věcné připomínky, věnovaný čas a trpělivost, kterou mi poskytl v průběhu vypracovávání bakalářské práce. Poděkování patří také kolegyním z Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty UPOL za příjemné pracovní prostředí a podporu. Poděkovat bych chtěla také ZOO-Zlín Lešná za vzorky DNA.

Souhrn

V této bakalářské práci jsem hledala nové polymorfní mikrosatelitové markery pro nesyta bílého (*Mycteria cinerea*) použitím metody *cross-species* PCR amplifikace.

V teoretické části bakalářské práce jsem se zabývala popisem řádu brodiví a jeho jednotlivých čeledí, ze kterých jsem se nejvíce věnovala čápovitým, do kterých patří nesyť bílý. Dále jsem popsala repetitivní sekvence, přičemž jsem se nejvíce soustředila na mikrosatelity, jejich dělení, mutace, využití a navrhování *de novo*, dále jejich použití u řádu brodiví a problémy při hodnocení.

V praktické části jsem hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy na genomické DNA vyizolované z 5 jedinců nesyty bílého s použitím metody *cross-species* PCR amplifikace.

Otestováním všech 206 dosud nalezených párů primerů pocházejících od zástupců řádů plameňáci a veslonozí jsem našla u nesyty bílého 19 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Z nich bylo 8 odvozeno od 2 druhů z řádu plameňáci a 11 od 7 druhů z řádu veslonozí. Počet alel se pohyboval od 2 do 4.

Summary

In this bachelor thesis I was looking for a new polymorphic microsatellite markers for Milky Stork (*Mycteria cinerea*) using the method of cross-species PCR amplification.

In the theoretical part of the thesis I focused on describing the order Ciconiiformes and its families, of which I have most devoted of storks to which they belongs Milky Stork. I described repetitive sequences, while I most focused on microsatellites, their division, mutations, using and designing *de novo*, as well as their use in order Ciconiiformes and problems in the scoring.

In the practical part I was looking for polymorphic microsatellite loci on genomic DNA isolated of five individuals Milky Storks using the method of cross-species PCR amplification.

By testing all 206 primer pairs derived from representatives of the order Pelecaniformes and Phoenicophormes. I totally found for Milky Stork 19 polymorphic microsatellite loci. Of these, 8 were derived from two species of order Phoenicophormes and 11 microsatellites from 7 species of the order Pelecaniformes. Number of alleles ranged from 2 to 4.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíle práce.....	8
3	Literární přehled	9
3.1	Řád brodiví.....	9
3.1.1	Čeď volavkovití	10
3.1.2	Čeď ibisovití	11
3.1.3	Čeď člunozobcovití.....	11
3.1.4	Čeď kladivoušovití.....	12
3.1.5	Čeď čápovití.....	12
3.1.5.1	Nesyt bílý	13
3.2	Repetitivní DNA	15
3.2.1	Satelity	15
3.2.2	Minisatelity	16
3.2.3	Mikrosatelity	16
3.2.3.1	Mechanismy mutace mikrosatelitů	17
3.2.3.2	Využití mikrosatelitů.....	17
3.2.3.3	Hledání mikrosatelitů	18
3.2.3.4	Mikrosatelity u ptáků řádu brodiví	19
3.2.3.5	Mikrosatelitové lokusy navržené pro volavkovité.....	19
3.2.3.6	Mikrosatelitové lokusy navržené pro ibisovité.....	20
3.2.3.7	Mikrosatelitové lokusy navržené pro čápvité.....	21
3.2.4	Problémy při hodnocení mikrosatelitů	22
3.2.4.1	Nulové alely	22
3.2.4.2	Stutter bandy	22
3.2.4.3	Alelová homoplazie.....	23
4	Materiál a metody.....	24
4.1	Biologický materiál.....	24
4.2	Izolace genomické DNA z ptačí krve pro PCR.....	24
4.3	Testované mikrosatelitové lokusy	25
4.4	PCR amplifikace	27
4.5	Zpracování PCR produktů.....	29
4.6	Použité chemikálie	31
4.7	Použité roztoky	32
4.8	Seznam laboratorních přístrojů	34
5	Výsledky	36
6	Diskuze.....	44
7	Závěr	48
8	Seznam použitých zkratk	49
9	Použitá literatura	50

1 Úvod

Mikrosatelity jsou tandemové repetice, které se vyskytují v DNA, a jejich nejvýznamnější vlastností je, že se u nich vyskytuje vysoký stupeň polymorfizmu, který souvisí s jejich vysokou mutační rychlostí. Díky tomu se staly hojně využívanými genetickými markery. Používají se například při studiu paternity, identifikaci jedinců, k fylogenetickým či k populačně-genetickým studiím.

V této bakalářské práci se budu zabývat hledáním polymorfních mikrosatelitů u nesyta bílého (*Mycteria cinerea*), který je řazen do čeledi čápovití. K tomuto účelu použiji genomickou DNA vyizolovanou z 5 jedinců a metodu *cross-species* PCR amplifikace, při které otestuji celkem 206 párů primerů, které byly původně navrženy pro ptáky z řádu plameňáci (Phoenicopteriformes) a z řádu veslonozí (Pelecaniformes).

2 Cíle práce

1. Shromáždit dostupné literární zdroje.
2. Sepsat literární rešerši na téma bakalářské práce.
3. Provést *cross-species* PCR amplifikaci na genomické DNA nesyta bílého (*Mycteria cinerea*) s využitím všech existujících polymorfních mikrosatelitů popsaných pro druhy z řádů veslonozí a plameňáci.
4. Zoptimalizovat teplotu *annealingu* a čas elektroforetické separace u polymorfních mikrosatelitů a stanovit počet alel.

3 Literární přehled

3.1 Řád brodiví

Řád brodiví čítá 115 druhů, které jsou až na výjimku polárních oblastí rozšířeny po celém světě. V ČR se podle aktuálních informací vyskytuje 9 druhů. Čeleď čápkovitých je u nás zastoupena čápkem bílým a čápkem černým. Z čeledi volavkovitých je možné ve volné přírodě spatřit volavku bílou, volavku červenavou a volavku stříbřitou. A dále se zde vyskytuje bukač velký, bukáček malý, kvakoš noční a kolpík bílý.

Taxonomické rozdělení řádu brodiví dle Hudce a Černého (1994):

Řád: brodiví (Ciconiiformes)

Čeleď: volavkovití (Ardeidae)

Čeleď: ibisovití (Threskiornithidae)

Čeleď: člunozobcovití (Balaenicipidae)

Čeleď: kladivoušovití (Scopidae)

Čeleď: čápkovití (Ciconiidae)

Zástupci řádu brodivých jsou charakterizováni jako střední až velcí ptáci se značnou podobností mezi jednotlivými druhy (Šťastný *et al.*, 1998). Typickým znakem tohoto řádu jsou protáhlé nohy, a to obzvláště v oblasti běháku a bérce. Velká část bérce, která se nachází nad patou, zůstává bez opeření (Hudec, 1994). Na drápu středního prstu mají pilovité zoubky (Hudec, 1972). Ačkoliv mají brodiví dlouhé nohy, které by mohli použít k běhu, pohybují se pomalu a v případě potřeby úniku vzlétnou (Hudec, 1994).

Zástupci brodivých většinou obývají teplejší oblasti a do chladnějších pásem pronikají jen některé druhy, které před zimním obdobím odlétají na zimoviště. Dlouhé tahy nejsou ovšem spojeny jen se zimovištěm, bývají typické i pro tropické druhy, které se přesouvají v době dešťů, sucha, či vlivem změny zdrojů potravy (Šťastný *et al.*, 1998).

Jejich potrava je různorodá a podle toho mají i částečně přizpůsobený tvar a délku zobáku. Potravu vyhledávají v širokém okolí svých hnízd, a to ve vzdálenosti do

10, někdy až 60 km (Šťastný *et al.*, 1998). Živí se rybami, korýši, červy a žábami (Gaisler *et Zima*, 2007).

Brodiví mají lehkou a pneumatizovanou kostru. Kostra dlouhého krku obsahuje větší počet obratlů a to v rozmezí od 16 do 20. Vyskytuje se u nich většinou malý jazyk, jícen je bez volete. Zpracování potravy umožňuje tenkostěnný, roztažitelný svalnatý žaludek. Pylorická oblast je dobře vyvinuta. V návaznosti na žaludek lze pozorovat většinou malá a zakrnělá slepá střeva (Hanzák, 1994).

Jsou to výborní letci, kteří využívají proudů vzduchu nad pevninou. Jejich létání bývá označováno jako statické plachtění (Šťastný *et al.*, 1998). Při letu mají natažené nohy, které přechíňují krátký ocas (Hanzák, 1994). Hnízdí v párech či v koloniích. Hnízda si stavějí většinou v blízkosti vod. Často hnízdí na stromech, v rákosí či v bažinách (Šťastný *et al.*, 1998). Mláďata jsou nidikolní a pečují o ně oba rodiče (Gaisler *et Zima*, 2007).

Opeření těla je poměrně řídké a vyznačuje se jednoduchým zbarvením (Gaisler *et Zima*, 2007). Mají drobná prachová pera (Hanzák, 1974). Pro péči o peří je vyvinuta jak kostrční žláza, tak i drobný prach uvolňující se rozpadem peří (Gaisler *et Zima*, 2007).

Sociální chování brodivých ptáků je rozmanité. Některé druhy žijí samostatně po celý rok, někteří zástupci žijí trvale v párech či v hnízdních koloniích. Tyto hnízdní kolonie mohou být rozsáhlé a mohou čítat až stovky párů. Dospělými jedinci se brodiví stávají mezi prvním až pátým rokem, kdy pohlavně dospívají. Velké druhy se mohou dožít i kolem 40 let (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.1 Čeleď volavkovití

Volavkovití jsou početná čeleď štíhlých ptáků, kteří se vyznačují speciální úpravou šestého krčního obratle, který umožňuje esovité prohnutí krku. Toto anatomické uzpůsobení je zvláště důležité pro vystřelovací mechanismus získávání potravy. Způsob takového získávání potravy bývá označován jako harpunování (Šťastný *et al.*, 1998). Hlavní potravou volavkovitých jsou ryby (Hanzák, 1974). Volavkovití mají na rozdíl od ostatních brodivých zakrnělou kostrční žlázu. Vyskytuje se u nich ale práškovitý pudr, který vzniká rozpadem prachového peří na hrudi a na kostrči. Tento prach zasypává obrysové peří a nahrazuje tak funkci kostrční žlázy (Hudec, 1994).

Zástupci čeledi volavkovitých osídlují všechny světadíly, kde vyhledávají především vody vnitrozemí. Nejčastěji hnízdí v křovinách nebo porostech vodního rostlinstva, vyskytují se ale i v lesích, které jsou daleko od vody. Menší druhy volavek mívají ve snůšce 3 až 6 vajec, větší druhy snášejí okolo 7 vajec. Mláďata se zdržují poměrně dlouho v hnízdech. Rodiče jim přinášejí potravu, kterou jim vyvrhují přímo do zobáku (Hudec, 1963).

Volavky se často projevují svéráznými zvukovými projevy, které doprovází agresivní chování. Mají totiž na rozdíl od většiny brodivých vyvinuté hlasové ústrojí (Hudec, 1994). V nebezpečí zauímají buď krycí nebo výstražné postavení (Hudec, 1972). Nejvýraznější zvukové projevy lze zaslechnout při toku (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.2 Čeleď ibisovití

Ibisovití jsou středně velcí ptáci, kteří obývají velkou část planety. Dělí se do dvou skupin, a to do podčeledi ibisové a do podčeledi kolpící. Ibisové vyhledávají bažinaté oblasti či močály a jejich zobák je dlouhý, dole zahnutý. Kolpící mají lopatkovitě rozšířený konec zobáku a vyskytují se také v bažinatých oblastech (Hudec, 1972). Ibisovití se vyznačují širokými a dlouhými křídly, krátkým ocasem a rychlým letem s krkem nataženým vpřed (Šťastný *et al.*, 1998). Mají dlouhé nohy se čtyřmi dlouhými prsty, kdy 3 z nich jsou spojeny blankou (Hudec, 1972). Živí se hlavně červy a měkkýši (Gaisler *et Zima*, 2007). K tomuto způsobu získávání potravy z bahna mají přizpůsobený zobák, který je dlouhý a srpovitě dolů zahnutý. Jazyk mají zakrnělý (Hudec, 1972). Na hlavě mívají holá místa nebo kožovité záhyby, často mívají prodloužená pera. Zbarvení bývá u obou pohlaví stejné, samci dosahují větší velikosti (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.3 Čeleď člunozobcovití

Tato čeleď je zastoupena jen jediným rodem s jediným druhem. Systematické zařazení čeledi je dost nejasné. V některých znacích je člunozobec podobnější volavkám, v jiných znacích se zase podobá čápům (Šťastný *et al.*, 1998). Člunozobec se vyznačuje nápadným zobákem, který připomíná tvar střevíce, a který dal této čeledi název. Na nohách má dlouhé prsty, které jsou volné. Při stání tiskne člunozobec svůj zobák na vole. Typickým prostředím pro tento druh jsou nepřístupné bažiny v povodí řek a jezer střední Afriky. Zde také získává svou potravu, která je tvořena rybami, žábami, želvami a dokonce i malými krokodýly (Hudec, 1963).

3.1.4 Čeleď kladivoušovití

Skupina, která je podobně jako člunozobcovití zastoupena jen jediným rodem s jedním druhem, získala český název kladivoušovití. Kladivouš je pták poměrně svérázného vzhledu, který částečně připomíná malého čápa. Oproti čápovi má však kratší silné nohy. Přední prsty kladivouše jsou spojeny neširokým kožním lemem (Šťastný *et al.*, 1998). Na hlavě má širokou, hustou chocholku, která směřuje dozadu. Při letu je jeho krk lehce ohnutý. Je pro něj typický u kořene vysoký, ze stran zploštělý zobák. Vyskytuje se v párech, popřípadě v malých společnostech, vždy v blízkosti vod. Žije v Africe, na Madagaskaru a v Arábii (Hudec, 1963). Potrava je složena hlavně z žab, živí se ale i drobnými korýši, hmyzem a rybami (Šťastný *et al.*, 1998).

Od všech blíže příbuzných skupin se kladivouš odlišuje způsobem chování. Jedinci se svérázně a poměrně často vyhupují na hřbet druhého jedince. Tyto projevy připomínají kopulaci. Na hřbetu může být jak samec, tak i samice (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.5 Čeleď čápoovití

Čápoovití jsou dobře definovaná skupina, jejíž fosilní pozůstatky jsou datovány již do období starších třetihor do svrchního eocénu a byly nalezeny ve Francii (del Hoyo *et al.*, 1992). Tato čeleď je rozdělena do 17 druhů, které obývají všechny světadíly, avšak v Evropě a tropické Americe se vyskytují jen po dvou družích (Hudec, 1963). Čápoovití se dělí do tří tribů a to Mycterini, Ciconiini a Leptoptilini. Tribus Mycterini se dělí na rod *Anastomus* a *Mycteria*. Tribus Ciconiini obsahuje 7 druhů rodu *Ciconia* a poslední tribus Leptoptilini zahrnuje rody *Ephippiorhynchus*, *Jabiru* a *Leptoptilos* (del Hoyo *et al.*, 1992)

Čápoovití jsou velcí ptáci s dlouhýma nohama, u nichž jsou prsty spojeny mělkým kožovitým záhybem (Šťastný *et al.*, 1998). Postrádají typický znak brodivých a to pilovité zoubky na drápu středního prstu a ještě jim chybí drobná prachová pera (Hanzák, 1974). Většina druhů je černo-bíle zbarvena bez větších pohlavních rozdílů. Co do velikosti bývá samice většinou trošku menší než samec (Šťastný *et al.*, 1998).

Zástupci čeledi čápoovitých mají dlouhá, široká křídla a jsou to výborní letci, kteří využívají proudy vzduchu nad pevninou, a tak jsou schopni plachtit bez jediného pohybu křídel (Hudec, 1963). Při plachtění, až na čápa marabu, mají krk natažený dopředu. Hlasové ústrojí je vyvinuto u mláďat, ale s postupným dospíváním ztrácejí jedinci muskulaturu hlasového aparátu a tedy i schopnost hlasového projevu (Hanzák,

1974). Přestože nemají hlas, vydávají syčivé zvuky nebo klapou zobákem (Šťastný *et al.*, 1998).

Čápovití se většinou vyskytují ve stepním až polostepním prostředí. Hnízdí na vyvýšených místech. Hnízda z rákosí si stavějí na stromech, skalách nebo i na lidských příbytcích. Žijí v trvalých párech (Šťastný *et al.*, 1998). Čápovití se většinou vyskytují trvale v jedné oblasti, jen zřídka kdy migrují. Je však známo mnoho způsobů přemísťování např. při hledání nových zdrojů potravy (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.1.5.1 Nesyt bílý

Jedním ze zástupců čeledi čápovitých z tribu Mycterini a rodu *Mycteria* je nesyt bílý (*Mycteria cinerea*). Tento ptačí druh se vyskytuje v Kambodži, Indonézii a Malajzii (Kůs *et Pflieger*, 2000). Nesyt bílý je v současné době veden jako ohrožený druh, protože u něj došlo k rychlému úbytku populace v důsledku ztráty pobřežních stanovišť, lovu a rušení lidmi. Jeho současná populace je odhadována na 5550 jedinců v Indonézii, 5000 jedinců na Sumatře a 400 jedinců v západní Jávě (Iqbal *et al.*, 2008).

Systematické zařazení druhu nesyt bílý (Myers, 2014):

říše:	živočišná (Animalia)
kmen:	strunatci (Chordata)
podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
třída:	ptáci (Aves)
podtřída:	létaví (Neognathae)
řád:	brodiví (Ciconiiformes)
čeleď:	čápovití (Ciconiidae)
rod:	nesyt (<i>Mycteria</i>)
druh:	nesyt bílý (<i>Mycteria cinerea</i>)

Nesyt bílý je poměrně velký zástupce řádu brodivých, jehož výška těla se pohybuje od 90 do 100 cm a jeho hmotnost je kolem 3 kg (Kůs *et Pflieger*, 2000). Český přídomek bílý je spojen s jeho bílým zbarvením peří. To pokrývá skoro celé tělo.

Výjimku tvoří červeně zbarvené peří okolo zobáku. Zobák je žlutý. Dlouhé nohy jsou zbarveny červeně. Celkové bílé zbarvení peří nesyta bílého narušují černé konce letek (del Hoyo *et al.*, 1992). Jedinou výjimkou změny zbarvení peří je doba označovaná jako přepeření, při kterém dochází k výměně per současných za pera s růžovým zbarvením, které časem přechází do bílé.

Obrázek 1: Nesyt bílý nafocený v ZOO-Zlín Lešná. Foto: Miroslav Pokorný



Potravu loví většinou v bažinách. Hnízdí v mangrovových oblastech nebo sladkovodních či rašelinových bažinách. Jeho výskyt byl také zaznamenán u jezer, močálů a rybníků. Někdy se vyskytuje i v blízkosti lidských sídel (del Hoyo *et al.*, 1992, Kús *et Pflieger*, 2000). V potravě nesytů převládají ryby, obojživelníci, plazi, korýši a hmyz (Kús *et Pflieger*, 2000). Denní příjem potravy se pohybuje okolo 630 g na jedince a toto množství potravy je jedinec schopen nalovit během dvou hodin (del Hoyo *et al.*, 1992).

Nesyti nejčastěji hnízdí na 6 až 12 metrů vysokých stromech podél břehů, ale mohou se vyskytovat i v blízkosti lidských obydlí. Hnízda si stavějí v koloniích, které mohou mít až 100 hnízd a často se jedná o vícedruhové kolonie, kde lze společně s nimi spatřit volavky, ibisy a kormorány. Hnízdí v monzunových oblastech, kde se vyskytují

od listopadu do března (Kůs *et Pfleger*, 2000). Ve snůšce mívají 1 až 4 vejce (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.2 Repetitivní DNA

Nekódující DNA je z menší části tvořena regulačními oblastmi a introny, ovšem převážnou část tvoří repetitivní DNA. Je tvořena nukleotidovými sekvencemi, které se v genomu vyskytují v mnoha kopiích. Až na výjimky se nevyskytují uvnitř genů (Campbell *et Reece*, 2006). Repetitivní DNA tvoří podstatnou součást eukaryotického genomu (Snustad *et Simmons*, 2009). Podle uspořádání a délky opakujících se sekvencí ji lze rozdělit na rozptýlenou repetitivní a tandemově repetitivní DNA (Bennett, 2000).

Campbell *et Reece* (2006) uvádějí, že rozptýlená repetitivní DNA se vyskytuje v eukaryotickém genomu. Jedná se o typ DNA, kdy se opakující jednotky nevyskytují v uspořádání za sebou, ale jsou v genomu roztroušeny. Autoři dále uvádějí, že většinu repetitivních sekvencí DNA zřejmě tvoří transpozóny, což jsou pohyblivé genetické elementy.

Tandemově repetitivní DNA je tvořena velkým počtem kopií a je možné ji rozdělit do tří typů. První typ představuje mikrosatelitní DNA, která obsahuje krátké úseky, jenž se opakují 10 až 100 krát. Druhým typem je satelitní DNA, u které se stejné úseky opakují 100 až milion krát. Posledním typem tandemově repetitivní DNA je minisatelitní DNA, u které se stejné segmenty opakují 100 až 100 000 krát (Campbell *et Reece*, 2006).

Tandemově repetitivní DNA se dá rozdělit také podle délky základního motivu. Satelity mohou mít od 100 do 300 párů bází, minisatelity od 6 do 100 párů bází a mikrosatelity do 1 do 6 párů bází (Vergnaud *et Denoeud*, 2000; Lai, 2003).

3.2.1 Satelity

Bennett (2000) uvádí, že satelitní DNA byla pojmenována podle toho, že se při centrifugaci v hustotním gradientu oddělovala jako minoritní nebo též satelitní proužek DNA. Autor dále uvádí, že délka základní jednotky opakování satelitní DNA se může lišit od pouhých pěti až po několik set párů bází. Nicméně celkové opakování je v genomu jednoho lokusu obrovské a sekvence mohou nabývat od 100 kb do několika Mb. Satelitní DNA není přepisována a nachází se v heterochromatinovém

(kondenzovaném) stavu. Tento druh DNA se využívá např. pro profilování nebo pro studium variability.

3.2.2 Minisatелity

Minisatелity jsou krátké tandemové repetice o délce základního motivu 6 až 100 párů bází. Přestože první příklady minisatелitů byly lidského původu, podobné struktury byly nalezeny u mnoha organismů, včetně bakterií. Obecně platí, že většina klasických minisatелitů je bohatá na GC páry bází (Vergnaud *et* Denoeud, 2000).

Minisatелity je možno rozdělit na dva typy. První typ představuje telomerickou DNA, která se skládá z 10 až 15 kb hexanukleotidových opakování - většinou se jedná o opakování TTAGGG bází, která jsou součástí telomerických konců chromozómů. Tyto oblasti slouží k ochraně chromozómů před degradací a zabezpečují kompletní replikaci telomerických sekvencí. Druhým typem minisatелitních DNA sekvencí jsou hypervariabilní DNA minisatелity, jejichž základní jednotka opakování se pohybuje od 6 do 50 nukleotidů. Tyto opakující se sekvence jsou také známe pod zkratkou VNTRs, což je zkratka z anglického Variable Number of Tandem Repeats (Bennett, 2000).

Minisatелity jsou charakteristické polymorfizmem. Tato vlastnost souvisí se schopností mutace, a to v rozsahu od 0,4 do 5 % za generaci. Tato mutabilita souvisí s vysokou proměnlivostí, kdy často existuje vysoký polymorfizmus v počtu repetice v rámci jednoho lokusu (Flegr, 2009).

3.2.3 Mikrosatелity

Mikrosatелity patří mezi tandemové repetice DNA. Jednotka repetice se pohybuje obvykle v rozmezí od 1 do 6 párů bází (Lai, 2003). Mikrosatелity se vyskytují v genomu jak u eukaryotních, tak i u prokaryotních organismů, v kódujících i nekódujících oblastech. Na základě struktury a uspořádání lze mikrosatелity označit jako krátké tandemové repetice (STRs – Short Tandem Repeats), nebo repetice jednoduchých sekvencí (SSRs – Simple Sequence Repeats) (Zima, 2004). Zastoupení mikrosatелitů v genomu pozitivně koreluje s jeho velikostí, avšak u rostlin se vyskytuje negativní korelace. U savců je výskyt mikrosatелitů nejvyšší. V lidském genomu se vyskytuje přes milion mikrosatелitových lokusů. Nejvíce jsou zastoupeny dinukleotidové opakující se sekvence, následují mono- a tetranukleotidové sekvence. Trinukleotidové opakující se sekvence jsou zastoupeny nejméně (Ellegren, 2004).

Oliveira *et al.* (2006) uvádějí, že se mikrosatelity mohou ještě na základě struktury opakující se sekvence dělit na 4 typy. V prvním typu, který je označován jako dokonalé, není jednotka repetice přerušena žádnou z bází, která do repetice nepatří. Zatímco ve druhém typu (nedokonalé mikrosatelity) se vyskytuje pár bází, který nepatří k opakujícímu se motivu. Může se například jednat o bázi C v řetězci TA (TATATATACTATATA). Mikrosatelity, které autoři článku označují, jako přerušované jsou takové, do kterých je vložený krátký motiv bází např. TATATACCGTGTTATATATATA. Mikrosatelity označené jako složené obsahují ve své sekvenci dvě za sebou následující repetice, které jsou umístěny za sebou např. TATATATATAGTGTGTGTGTGT.

Zajímavé bylo zjištění, že se v lidském genomu vyskytuje mikrosatelitní, tripletová sekvence, která je zodpovědná za mentální onemocnění, které se označuje jako syndrom fragilního X. V případě tohoto onemocnění se v alele fragilního X opakuje triplet CGG stokrát až tisíckrát, což vede k vytvoření křehkého (fragilního) místa. V normální alele je tento triplet zopakován třicetkrát. Další onemocnění spojené s výskytem mikrosatelitů se označuje jako Huntingtonova choroba, a v tomto případě dochází k podobnému mechanismu jako u syndromu fragilního X, zde však dochází k opakování tripletů CAG (Campbell *et al.*, 2006).

3.2.3.1 Mechanizmy mutace mikrosatelitů

Přestože jsou mikrosatelity používané v širokém spektru genetických studií, mutační mechanismy těchto oblastí DNA nejsou stále dobře vysvětleny a chápány. Je známo, že mutační rychlost u mikrosatelitů je vyšší než u ostatních částí genomu a pohybuje se v rozmezí od 10^{-2} do 10^{-6} nukleotidů na lokus za generaci. Byly navrženy některé mechanismy, které by mohly vysvětlit vysokou rychlost mutací u mikrosatelitů, mezi které patří chyby během rekombinace, nerovnoměrný *crossing-over* a sklouznutí polymerázy během replikace nebo reparace (Oliveira *et al.*, 2006).

3.2.3.2 Využití mikrosatelitů

Významnou vlastností mikrosatelitů je, že vykazují vysoký polymorfismus, který souvisí s vysokou variabilitou počtu jednotek repetice. Díky tomu se používají k mapování genomu a dále jako markery v populační genetice pro vnitrodruhové a vnitropopulační studie či pro fylogenetické studie v rámci příbuzných druhů (Ellegren 2004; Flegr, 2009).

Hlavní nevýhodou mikrosatelitů je jejich izolace *de novo*, a to především u organismů, které jsou zkoumány poprvé. Tato nevýhoda spočívá v tom, že se mikrosatelity obvykle vyskytují v nekódujících oblastech, kde jsou substituce nukleotidů častější než v kódujících oblastech. Z tohoto důvodu je strategie navrhování univerzálních primerů pro mikrosatelity náročná (Zane, 2002).

3.2.3.3 Hledání mikrosatelitů

Zane *et al.* (2002) uvádějí postup pro izolaci mikrosatelitů *de novo*. Tradičně se mikrosatelitové lokusy izolují z genomových knihoven, kdy jsou vybrány malé úseky DNA od zkoumaného druhu. Postup izolace *de novo* se může zdát poměrně jednoduchý v případě genomu s vysokým obsahem mikrosatelitů, ovšem v případě zdrojového druhu s nízkou frekvencí mikrosatelitů je tento postup izolace zdoluhavý a finančně náročný. Proto bylo navrženo několik alternativních strategií, které by mohly urychlit izolaci takto navržených mikrosatelitů.

Vysoce kvalitní genomická DNA je rozštěpována pomocí restrikčních enzymů či pomocí ultrazvuku, přičemž použití ultrazvuku je méně časté. Následně jsou vzniklé fragmenty o optimální délce 300-700 bp vloženy do plazmidového vektoru a to buď přímo, nebo ligací na zvláštní adaptory. Tento krok je považován za kritický vzhledem k možnosti získání nízkého počtu rekombinantů a tvorby kontaminace mezi genomovými fragmenty. Následně je plazmid vložen do bakterií a je provedena selekce klonů, které jsou pozitivní. Ty se identifikují pomocí blottingu a hybridizací se sondami, které obsahují repetitivní sekvence. Po selekci se namnoží bakterie, které obsahují plazmid s vloženými mikrosatelitovými sekvencemi. Pak se provede sekvenace mikrosatelitových lokusů, navržení primerů. Následuje kontrolní PCR reakce k ověření funkčnosti získaných párů primerů. Nakonec se zjišťuje polymorfismus získaného mikrosatelitového lokusu u kontrolní skupiny nepříbuzných jedinců (Zane, 2002).

Poté co je navržený mikrosatelit otestován a vyhodnocen jako polymorfní, je ještě statisticky zhodnocen. U amplifikovaných mikrosatelitů se zjišťuje frekvence alel, dále se musí zjistit, zda nejsou ve vazbě a zda se nejedná o markery vázané na pohlaví. Pomocí statistických programů se hodnotí soulad s Hardy - Weinbergovým zákonem a zda byly tyto odchylky způsobeny přítomností nulových alel (Zane, 2002).

Protože je navrhování primerů *de novo* časově i finančně náročné využívá se *cross-species* PCR amplifikace, při které se nemusí primery pro PCR amplifikaci

navrhovat *de novo*, ale použijí se primery již navržené pro blízké příbuzné druhy (Zane, 2002).

3.2.3.4 Mikrosatelity u ptáků řádu brodiví

Přestože řád brodiví zahrnuje 5 čeledí, byly doposud publikovány práce o použití mikrosatelitů jen z čeledi čápoovití, ibisovití a volavkovití. Většina autorů navrhuje pro práci mikrosatelity *de novo*, menší část využívá k hledání polymorfizmu *cross-species* PCR amplifikace (Chang *et al.*, 2005)

3.2.3.5 Mikrosatelitové lokusy navržené pro volavkovité

McGuire *et Noor* (2002) hledali jako první mikrosatelity u volavkovitých. Navrhli a syntetizovali páry primerů pro 17 mikrosatelitových lokusů pro volavku velkou (*Ardea herodias*). Při testování na 60 jedincích z nich bylo 15 polymorfních s počtem alel od 2 do 18 a tyto primery byly dále použity pro *cross-species* PCR amplifikace u příbuzných druhů, konkrétně pro volavku bílou (*Ardea alba*), volavku popelavou (*A. cinerea*) a volavku jihoamerickou (*A. cocoi*).

Chang *et al.* (2005) se zabývali *cross-species* PCR amplifikací mikrosatelitů u kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), při které použili 8 párů primerů. Tyto páry primerů byly původně nasyntetizovány pro volavku velkou a autoři u nich našli od 2 do 18 alel při testování na 67 jedincích.

Pro kvakoše nočního byly dále navrženy *de novo* primery, ze kterých bylo u 32 jedinců 11 párů polymorfních s počtem alel od 4 do 13 na lokus. Autoři testovali tyto mikrosatelity na dalších 11 druzích volavek. Uvádějí ale pouze informace o úspěšnosti PCR amplifikace, nikoliv o polymorfizmu (Chang *et al.*, 2009).

Další polymorfní mikrosatelitové lokusy byly izolovány z ohroženého druhu volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*). Mikrosatelity navržené pro volavku velkou nemohly být pro studium diverzity volavky žlutozobé použity, protože nebyly polymorfní nebo bylo u této volavky více jejich kopií. Z tohoto důvodu byl izolován soubor 18 mikrosatelitních lokusů *de novo*. Počet alel byl v rozmezí od 2 do 9 na lokus při testování na 20 jedincích. Navržené mikrosatelitové lokusy byly také použity pro *cross-species* PCR amplifikace pěti druhů volavkovitých konkrétně pro volavku bílou, volavku čínskou, volavku pobřežní, volavku rusohlavou a volavku stříbřitou. Uvádějí,

že amplifikace proběhla s úspěšností od 77,78 % do 100 %, ale neuvádějí, kolik z testovaných mikrosatelitů bylo polymorfních (Huang *et al.*, 2010).

Mikrosatelitové lokusy u volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) zkoumali také Dai *et al.* (2013). Při testech použili 32 jedinců a našli celkem 23 polymorfních lokusů s počtem alel od 2 do 9.

Campanini *et al.* (2012) našli při testech na 35 jedincích volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*) 11 polymorfních mikrosatelitů. Počet alel se pohyboval od 2 do 4 na lokus.

Další mikrosatelitové lokusy byly navrženy *de novo* pro volavku červenavou (*Egretta rufescens*). Cílem studie bylo izolovat a charakterizovat polymorfní mikrosatelitové lokusy pro zkoumání struktury populace této vzácné volavky. Pro analýzy bylo použito 31 jedinců z jedné kolonie. Z nově navržených lokusů bylo celkem 12 polymorfních a počet alel se pohyboval od 2 do 10 na lokus (Hill *et al.*, 2010).

3.2.3.6 Mikrosatelitové lokusy navržené pro ibisovité

Lei *et al.* (2005) provedli *cross-species* PCR amplifikaci při které využili 22 párů primerů, které byly původně navrženy pro kura domácího (*Gallus gallus*), pro kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a tura domácího (*Bos primigenius*). Z tohoto souboru primerů vybrali 4 páry, které byly vhodné pro genetické studie u ibise japonského. Mikrosatelity od kapra poskytly 2 alely a od tura 7 alel.

Pro tohoto kriticky ohroženého ibise japonského (*Nipponia nippon*), jehož současná populace se vyvinula ze čtyř posledních volně žijících jedinců objevených v roce 1981, našli Ji *et al.* (2004) 8 polymorfních dinukleotidových nebo trinukleotidových mikrosatelitových lokusů se 2 nebo 3 alelami a 5 monomorfních mikrosatelitových lokusů. Autoři dále uvádějí, že tyto mikrosatelity testovali u ibise černohlavého (*Threskiornis melanocephalus*) a našli 5 polymorfních mikrosatelitů se 2 nebo 3 alelami. Dalších 11 párů primerů pro ibise japonského popsali a úspěšně otestovali He *et al.* (2006) na 36 jedincích a našli 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů, kde se počet alel na lokusu pohyboval od 2 do 5.

Santos *et al.* (2006) publikovali 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů pro ibise rudého (*Eudocimus ruber*). V rámci studie provedli analýzu 45 jedinců ze tří brazilských přírodních populací a zjistili, že rozmanitost alel se pohybovala od 3 do 17.

O dva roky později využil Wilson (2008) u ibise posvátného (*Threskiornis aethiopicus*) *cross-species* PCR amplifikaci s páry primerů navrženými pro ibise japonského, vlaštovku obecnou (*Hirundo rustica*), pro lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) a pro tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*). Při amplifikacích na 36 jedincích detekoval 2 polymorfní mikrosatelity se 4 a 12 alelami. První byl původně popsán pro tučňáka kroužkového a druhý pro ibise japonského. Ostatní páry primerů poskytly monomorfní produkt.

Sawyer *et al.* (2006) našli u koplíka růžového (*Ajaia ajaja*) 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Při testování použili celkem 60 jedinců a našli od 2 do 9 alel.

U kolpíka malého (*Platalea minor*) našli Yeung *et al.* (2009) 23 mikrosatelitních lokusů. Jednalo se o dinukleotidový nebo trinukleotidový motiv opakování. Počet alel se pohyboval od 2 do 19 na lokus. Tyto mikrosatelitní lokusy poskytly dostatečný soubor pro použití *cross-species* PCR amplifikací u jiných druhů brodivých a to u ibise posvátného, ibise rudého, koplíka růžového, kvakoše nočního a u volavky bílé.

3.2.3.7 Mikrosatelitové lokusy navržené pro čápovité

První polymorfní mikrosatelitové lokusy pro čápovité byly charakterizovány u nesyta amerického (*Mycteria americana*). Autoři v tomto článku uvádějí, že našli 4 polymorfní lokusy s počtem alel od 2 do 3 při testech na 136 jedincích z devíti kolonií (Van den Bussche *et al.*, 1999).

Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) popsali u nesyta amerického dalších 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů. V článku uvádějí, že našli pět dinukleotidových, jeden trinukleotidový a pět tetranukleotidových mikrosatelitů. Použili 31 jedinců ze dvou populací a našli od 2 do 4 alel na lokus.

Shephard *et al.* (2009) publikovali izolaci 7 polymorfních mikrosatelitních lokusů pro čápa bílého (*Ciconia ciconia*) s počtem alel od 2 do 10. V článku dále uvádějí dalších 6 polymorfních mikrosatelitů od nesyta amerického (*Mycteria americana*) se 2 nebo 3 alelami. Nalezení nízkého počtu alel u většiny mikrosatelitů připisují autoři silnému efektu hrdla láhve, kterému byla populace vystavena.

Pomocí *cross-species* metody charakterizovali polymorfní mikrosatelity u čápa východního Huang *et al.* (2011), kteří testovali 36 párů primerů, ze kterých bylo 7 navrženo pro čápa bílého, 12 pro ibise japonského a 17 pro volavku velkou. Z 36 testovaných párů primerů poskytlo 11 polymorfní produkt, přičemž 5 bylo od čápa bílého a 6 od volavky velké.

Wang *et al.* (2011) publikovali studii, ve které hledali *de novo* polymorfní mikrosatelity u čápa východního. Celkem popsali 11 mikrosatelitů a testovali je na 23 jedincích. Všechny byly polymorfní a jeden z nich byl homozygotní u všech 23 jedinců. Autoři dále uvádějí, že počet alel se pohyboval od 2 do 8 na lokus.

3.2.4 Problémy při hodnocení mikrosatelitů

Při použití mikrosatelitů jako molekulárních markerů se mohou vyskytnout problémy. Hodnocení výsledků elektroforetické separace PCR produktů ztěžuje přítomnost nulových alel, *stutter* bandů a alelová homoplazie.

3.2.4.1 Nulové alely

Jedním z problémů využití mikrosatelitů jako molekulárních markerů je výskyt jevu, který se označuje jako nulové alely. Nulové alely jsou takové, které nejsou amplifikovány pomocí PCR reakce a nelze je vizualizovat (Dakin *et* Avise, 2004). Mohou vznikat několika způsoby. Jedním z nich je případ, kdy se v oblastech označovaných jako *flanking regions* vyskytují takové mutace, které zabrání nasednutí primerů na templátové vlákno DNA v průběhu PCR reakce. Další možností vzniku nulové alely je sklouznutí polymerázy v průběhu PCR reakce nebo přednostní amplifikace kratších alel (Chapuis *et* Estoup, 2007)

3.2.4.2 Stutter bandy

Při hodnocení PCR produktů se mohou také vyskytnout *stutter* bandy, které se v literatuře vyskytují také pod označením stínové bandy a vznikají během PCR amplifikace při sklouznutí DNA polymerázy. Např. v případě, že se jedná o dinukleotidové repetice, je produkt PCR o jednu jednotku kratší oproti normálu. Vyskytují se i repetice, které byly při amplifikaci zkráceny o 2 nebo 3 jednotky, tedy o 4 nebo 6 nukleotidů. Problém při hodnocení výsledků mikrosatelitů nastává tehdy, když se *stutter* band jedné alely překrývá s hlavním produktem jiné alely (Walsh *et al.*, 1996).

3.2.4.3 Alelová homoplazie

Další jev, který může ovlivnit hodnocení výsledků je alelová homoplazie. Jedná se o jev, který je způsobený mutací. Vznikají tak stejně velké alely se stejnou sekvencí motivů, ale u různých druhů, které nepocházejí od stejného předka. Tyto alely se tedy liší původem (Estoup, 2002).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro praktickou část této bakalářské práce byla použita genomická DNA, která byla vyizolována z pěti jedinců nesyta bílého (*Mycteria cinerea*). Tento druh nesyta je úspěšně chován v ZOO Zlín - Lešná. Krev byla odebrána odbornými pracovníky této ZOO, zaslána do Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty UPOL a do doby izolace byla umístěna v Queen's lyzačním pufru v lednici při teplotě 4 °C.

4.2 Izolace genomické DNA z ptačí krve pro PCR

Samotnou izolaci DNA provedl fenol-chloroformovou metodou vedoucí práce. Postup izolace byl převzat z publikace Maniatis *et al.* (1982) a upraven pro materiálové a technické vybavení Laboratoře populační genetiky.

Izolace genomické DNA byla provedena ve třech dnech. První den byla k roztoku krve v Queen's lyzačním pufru přidána proteináza K a roztok SDS. Následně byly mikrozkušavky s takto připraveným roztokem inkubovány za překlápění přes noc do druhého dne v termostatu při 37 °C. Druhý den byl ke směsi přidán fenol a chloroform v poměru 1:1. Mikrozkušavky byly zcentrifugovány, vrchní vodná fáze byla odebrána do nových mikrozkušavek. K tomuto odebranému roztoku vrchní vodné fáze byl přidán opět chloroform, mikrozkušavky byly zvortexovány a znovu byla odebrána vrchní vodná fáze. Poté byl k tomuto roztoku přidán octan sodný a mikrozkušavky byly vyplněny 96% ethanolem. Po promíchání a uložení na dvě hodiny při -20 °C byly mikrozkušavky zcentrifugovány, ethanol byl opatrně slit a ke zbylé sraženině DNA byl přidán 1 ml vychlazeného 70% ethanolu. Dále byly mikrozkušavky zcentrifugovány, ethanol byl slit a mikrozkušavky se zbylým sedimentem DNA byly vysušeny v termobloku při 50 °C. Další den byla DNA rozpuštěna v TE pufru a byla stanovena její koncentrace na nanodropu. Nakonec byla vyizolovaná DNA naředěna deionizovanou vodou na koncentraci 5-25 µg/ml a uložena v mrazáku lednice při teplotě -20 °C.

4.3 Testované mikrosatelitové lokusy

S využitím všech dosud existujících mikrosatelitových lokusů popsanych pro druhy z řádů plameňáci a veslonoží byla provedena *cross-species* PCR amplifikace. Celkem bylo použito 206 párů primerů. Z těchto primerů bylo 47 párů navrženo pro řád plameňáci, konkrétně 10 párů primerů pro plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a 37 párů primerů pro plameňáka růžového (*P. roseus*). Větší skupina o 159 párech primerů byla navržena pro řád veslonoží (Pelecaniformes). Konkrétně se jednalo o páry primerů navržené pro faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*), fregatku obecnou (*Fregata minor*), kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), kormorána chocholátého (*P. aristotelis*), kormorána ušatého (*P. auritus*), kormorána velkého (*P. carbo*), kormorána tasvánského (*P. fuscescens*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pelikána severoamerického (*P. erythrorhynchos*), tereje guánového (*Sula variegata*), tereje modronohého (*S. nebouxii*) a tereje červenonohého (*S. sula*). Přehled mikrosatelitů, které byly testovány u nesýta bílého je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka 1: Přehled testovaných mikrosatelitových lokusů u nesýta bílého. Tabulka zahrnuje řád, zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu a autora publikace.

Řád	Zdrojový druh	Testované mikrosatelity	Autor publikace
Veslonoží (Pelecaniformes)	Faeton žlutozobý (<i>Phaethon lepturus</i>)	P3A3, P3D7, P3C1, P4F2, P3F3, P3F5, P3A4, P3G12, P3F7, P3G1, P3H10	Humeau <i>et al.</i> , 2011
	Fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18	Dearborn <i>et al.</i> , 2008
	Kormorán galapážský (<i>Phalacrocorax harrisi</i>)	PhB2, PhB4, PhB11, PhC11, PhD11, PhF12, PhG8, PhG12	Duffie <i>et al.</i> , 2008

Tabulka 1: Pokračování 1.

Řád	Zdrojový druh	Testované mikrosatelity	Autor publikace
Veslonoží (Pelecaniformes)	Kormorán chocholatý (<i>Phalacrocorax aristotelis</i>)	Phaari01, Phaari02, Phaari03, Phaari05, Phaari06, Phaari08, Phaari11, Phaari12, Phaari14, Phaari16	Barlow <i>et al.</i> , 2010
		Phaari04, Phaari07, Phaari09, Phaari13, Phaari15, Phaari17	dle Barlow <i>et al.</i> , 2010
	Kormorán ušatý (<i>Phalacrocorax auritus</i>)	Dcco-01, Dcco-02, Dcco-03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08	Mercer <i>et al.</i> , 2010
		COR 01, COR 03, COR 05, COR 06, COR 07, COR 12, COR 15, COR 17, COR 19, COR 20, COR 21, COR 22, COR 23, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 35, COR 38, COR 40, COR 41, COR 43, COR 45, COR 47	Fike <i>et al.</i> , 2009
	Kormorán velký (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	PcD2, PcD4, PcD5, PcD6, PcT1, PcT3, PcT4	Piertney <i>et al.</i> , 1998
	Kormorán tasmanický (<i>Phalacrocorax fuscescens</i>)	Pf7, Pf11, Pf13, Pf33, Pf35, Pf36, Pf39	Riordan <i>et al.</i> , 2013
	Pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265, PEL304	De Ponte Machado <i>et al.</i> , 2009
	Pelikán severoamerický (<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>)	PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 07, PeEr 08, PeEr 09	Hickman <i>et al.</i> , 2009
	Terej guánový (<i>Sula variegata</i>)	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-95, Sv2A-152, Sv2B-27, Sv2B-138	Taylor <i>et al.</i> , 2010

Tabulka 1: Pokračování 2.

Řád	Zdrojový druh	Testované mikrosatelity	Autor publikace
Veslonoží (Pelecaniformes)	Terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	Boob-RM2-F07, Boob-RM3-D07, Boob-RM3-F11, Boob-RM4-A08, Boob-RM4-B03, Boob-RM4-C03, Boob-RM4-D07, Boob-RM4-E03, Boob-RM4-E10, Boob-RM4-F11, Boob-RM4-G03	Faircloth <i>et al.</i> , 2009
		Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B-100	Taylor <i>et al.</i> , 2010
	Terej červenonohý (<i>Sula sula</i>)	Ss-1b-16, Ss-1b-51, Ss-1b-57, Ss-1b-98, Ss-1b-106, Ss-1b-142, Ss-2b-2, Ss-2b-35, Ss-2b-48, Ss-2b-71, Ss-2b-88, Ss-2b-92, Ss-2b-110, Ss-2b-138, Ss-2b-153	Morris-Pocock <i>et al.</i> , 2010
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák karibský (<i>Phoenicopiterus ruber</i>)	Pruμ 1, Pruμ 2, Pruμ 3, Pruμ 4, Pruμ 5, Pruμ 6, Pruμ 7, Pruμ 8, Pruμ 9	Kapil <i>et al.</i> , 2010
		Pruμ 13	Preston, 2005
	Plameňák růžový (<i>Phoenicopiterus roseus</i>)	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139	Geraci <i>et al.</i> , 2010

4.4 PCR amplifikace

Reakční směs pro PCR amplifikaci byla napipetována ze složek, které byly po celou dobu trvání praktické bakalářské práce uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C

a před každou PCR amplifikací byly rozmrazeny, zvortexovány a zcentrifugovány. Reakční směs byla pipetována do 1,5ml mikrozkušavek ze složek uvedených v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Složení PCR mixu pro 5 vzorků.

Složky PCR mixu	Objem [μ l]
Deionizovaná voda	44,4
Reaction Buffer 10x	6,7
MgCl ₂ (25 mmol/l)	4,0
dNTPs (20 μ mol/l)	0,7
Primer F (10 μ mol/l)	3,3
Primer R (10 μ mol/l)	3,3
aTaq DNA polymeráza (5U/ μ l)	1,0

Mikrozkušavky s napipetovanou reakční směsí byly zvortexovány a zcentrifugovány, aby se promíchaly všechny složky. Vyizolovaná genomická DNA o koncentraci 5-25 μ g/ml byla napipetována po 1 μ l do mikrozkušavek a k této genomické DNA bylo přidáno 9 μ l připravené reakční směsi. Mikrozkušavky s takto připravenou směsí byly uzavřeny a vloženy do termocykléru, jehož časový a teplotní profil byl následující:

94 °C 5 min

94 °C 30 s

teplota *annealingu* 30 s

72 °C 30 s

72 °C 7 min

} 35x

Počáteční reakce probíhala s každým párem primerů při teplotě *annealingu* 50 °C. Pokud byl testovaný mikrosatelitový lokus polymorfní, byla podle potřeby zvýšena teplota *annealingu* až na 67 °C a to z důvodu lepší rozlišitelnosti jednotlivých alel, zmírnění počtu a intenzity nadpočetných bandů, *stutter* bandů a pro zlepšení vizualizace.

4.5 Zpracování PCR produktů

Pro zpracování získaných PCR produktů byly použity vyhřívané elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra s použitím skel o rozměrech 330 x 390 mm a 330 x 420 mm s tloušťkou polyakrylamidového gelu 0,4 mm.

Příprava skel:

1. Menší sklo bylo důkladně omyto vodou za použití saponátu a kartáčku a následně bylo opláchnuto deionizovanou vodou.
2. Poté bylo osušeno papírovým ubrouskem do sucha, pak bylo dvakrát ošetřeno 96% ethanolem na ploše, která se bude dotýkat gelu a poté bylo znova osušeno.
3. Toto sklo bylo umístěno do digestoře a na jeho plochu, která se dotýká gelu, byl nanesen roztok molekulárního lepidla. Nanesený roztok byl ponechán 5 minut, aby zaschnul a po uplynutí této doby bylo sklo čtyřikrát opláchnuto 96% ethanolem a poté bylo opět otřeno papírovým ubrouskem.
4. Větší sklo bylo důkladně omyto deionizovanou vodou za pomoci kartáčku. Následně bylo vysušeno papírovým ubrouskem do sucha. Pak bylo dvakrát ošetřeno 96% ethanolem na ploše, která se dotýká gelu. Poté bylo znovu osušeno a ošetřeno přípravkem na odpuzování vody ze skel automobilů.
5. Po jeho zaschnutí (5 minut) bylo sklo dvakrát omyto deionizovanou vodou a vysušeno pomocí ubrousku.
6. Na větší sklo byly následně položeny po stranách dva 0,4 mm silné spacers a na ně bylo položeno menší sklo ošetřenou plochou dolů. Obě skla byla zajištěna po stranách dvěma páry klipsů.

Příprava 6% polyakrylamidového gelu pro elektroforetickou separaci:

1. V digestoři bylo připraveno 60 ml 6% roztoku akrylamidu. Ten byl opatrně vléván mezi skla, která byla zajištěna klipsy. V případě potřeby bylo jednou rukou poklepáváno na skla, aby se v gelu netvořily bubliny.
2. Po zaplnění celého prostoru mezi skly, byl na rozhraní velkého a malého skla (v místech, kde se naléval gel) vložen rovnou hranou hřebínek (1 cm hluboko). Skla s hřebínkem byla zajištěna v místě nalévání gelu pomocí 4 klipů a gel se nechal polymerizovat minimálně 50 minut.

Elektroforetická separace:

1. Po ztuhnutí gelu byly odstraněny klipsy, skla s gelem byla omyta vodou od zbytků gelu (hlavně v oblasti hřebínku). Takto připravená a osušená skla s gelem byla vložena do elektroforetické komůrky a upevněna po stranách pomocí úchytů.
2. Do anodového i katodového prostoru byl nalit 0,5x TBE pufr a byl opatrně vyjmut hřebínek z prostoru mezi skly. Poté byly pomocí stříkačky vymyty zbytky gelu, které se nacházely na rozhraní gel - pufr.
3. Katodový i anodový prostor byl uzavřen a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu byl nastaven výkon 90 W při hodnotách proudu 150 mA a napětí 3000 V, aby se gel mezi skly nahřál.
4. Po 30 minutách byl odpojen zdroj a prostor mezi skly byl opět vyčištěn pomocí stříkačky. Do gelu byl vsunut hřebínek, tentokrát zoubky směrem dolů, a to asi 1 mm do gelu.
5. Následně byly pomocí osmikanálové pipery naneseny vzorky o objemu 2 μ l, které byly v průběhu nahřívání skel připraveny přidáním nanášecího pufru k PCR produktu, a pak denaturovány 3 minuty a následně umístěny na led, aby bylo zabráněno renaturaci.
6. Po nanesení vzorků byl anodový i katodový prostor uzavřen, připojen ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu a byl nastaven výkon 70 W při proudu 150 mA a napětí 3000 V. Poté probíhala 1,5 až 3 hodiny elektroforetická separace.

Vizualizace gelu:

1. Po proběhnutí elektroforetické separace byl odpojen zdroj elektrického proudu, vypuštěn pufr a skla s gelem byla vyjmuta z elektroforetické komůrky.
2. Na rovné podložce byly opatrně vyjmuty spacers a s použitím nože byla od sebe odlepena skla.
3. Menší sklo s přichyceným gelem bylo vloženo gelem nahoru do fotomisky na třepačku a zalito fix/stop roztokem. Roztok působil 20 minut.
4. Po uplynuté době byl fix/stop roztok slit a uchován pro pozdější použití. Sklo s gelem bylo třikrát po 2 minutách promyto deionizovanou vodou.

5. Omyté sklo s gelem bylo opět umístěno na třepačku a bylo zalito 1% roztokem HNO_3 . Po 4 minutách (ne déle) byl roztok slit do výlevky a sklo s gelem bylo čtyřikrát promyto deionizovanou vodou.
6. Poté bylo sklo s gelem na třepačce zalito 0,1% roztokem AgNO_3 . Po 30 minutách byl 0,1% roztok AgNO_3 slit a sklo s gelem bylo ponořeno na 10 vteřin do deionizované vody. V posledním kroku vizualizace bylo sklo umístěno na třepačku a zalito vývojkou. Poté, co se dostatečně intenzivně zviditelnily hnědočerné proužky PCR produktů, byla reakce zastavena pomocí fix/stop roztoku.
7. Následně bylo sklo s gelem omyto ponořením do deionizované vody a vloženo na 30 minut do sušárny (60 °C), aby uschlo.

Hodnocení výsledků, odstranění gelu ze skla:

1. Po vysušení v sušárně bylo sklo vyhodnoceno na negatoskopu a naskenováno pomocí skeneru do počítače. Vyhodnocené sklo s gelem bylo ponořeno do roztoku NaOH (1 mol/l). Gel se ze skla odlepil a sklo bylo po umytí saponátem připraveno pro další použití.

4.6 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/ μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400 μl každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Lachema)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)

- Chloroform (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová - ledová (Lachema)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)
- N, N'-methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Proteináza K (Sigma)
- Rain Repellent - přípravek odpuzující vodu ze skel automobilů (Turtle Wax Europe B.V.)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.7 Použité roztoky

Queen's pufr:

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

Roztok octanu sodného CH_3COONa (3 mol/l):

- 408,24 g trihydrátu octanu sodného $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
- rozpustit v 800 ml deionizované H_2O
- upravit pH na hodnotu 5,2 pomocí ledové kyseliny octové

- objem doplnit deionizovanou vodou na 1 l

TE pufr:

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 200 µl zásobního roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustit v 800 ml deionizované H₂O
- po rozpuštění doplnit na 1 l a zfiltrvat

Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu (molekulární lepidlo):

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

Zásobní roztok akrylamidu (6%):

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované H₂O
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml 40 % zásobního roztoku akrylamid: N, N'-methylenbisakrylamid 19:1
- po rozpuštění všech složek zfiltrvat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

Polyakrylamidový gel (6%):

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈
- 40 µl N, N, N', N'-tetramethylethyldiaminu

Roztok peroxodisíranu amonného (10%):

- 1 g peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈
- rozpustit v 10 ml deionizované vody

Zásobní roztok TBE pufru (10x):

- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 55 g kyseliny borité H₃BO₃
- 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

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

Fix/stop roztok:

- 88 ml ledové kyseliny octové CH_3COOH
- objem doplnit deionizovanou H_2O na 800 ml

Roztok kyseliny dusičné HNO_3 (1%):

- 12 ml 65% kyseliny dusičné HNO_3
- objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml

Roztok dusičnanu stříbrného AgNO_3 (0,1%):

- 0,8 g dusičnanu stříbrného AgNO_3
- objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml a uložit do chladničky do 4 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Vývojka:

- 24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3
- objem doplnit deionizovanou H_2O na 800 ml uložit ve 4 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Roztok hydroxidu sodného NaOH (1 mol/l):

- 40 g hydroxidu sodného NaOH
- rozpustit v deionizované vodě
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

4.8 Seznam laboratorních přístrojů

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)

- Laboratorní váhy MARK S 622 (Bel Engeneering)
- Magnetická míchačka MR Hei – Standard (Heidolph)
- Mikropipety Finn timer 0,5 µl až 10 µl (osmikanálová) (Labsystems)
- Mikropipety Finn timer 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Cleaver Scientific)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna sterilizátor CAT 8050 (Contherm)
- Temperovaný blok (termoblok) 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)

5 Výsledky

6 Diskuze

7 Závěr

Při testování všech dosud existujících polymorfních mikrosatelitů popsaných pro druhy z řádů veslonozí a plameňáci jsem na genomické DNA 5 jedinců nesyta bílého (*Mycteria cinerea*) metodou *cross-species* PCR amplifikace našla 19 polymorfních mikrosatelitů.

Z nich bylo 11 amplifikováno primery, které byly původně navrženy pro řád veslonozí. Jednalo o 3 páry primerů od fregatky obecné, 3 páry primerů od tereje modronohého, 2 páry primerů od kormorána galapážského, 2 páry primerů od pelikána bílého a dále po jednom páru primerů od kormorána chocholatého, kormorána ušatého, pelikána severoamerického, kormorána velkého a faetona žlutozobého.

Zbývajících 8 polymorfních mikrosatelitových lokusů bylo amplifikováno páry primerů od 2 druhů z řádu plameňáci. Pět polymorfních mikrosatelitů pocházelo od plameňáka růžového a tři byly od plameňáka karibského.

Plameňák růžový byl tedy co do počtu polymorfních produktů nejúspěšnější. Při celkovém zhodnocení byla větší úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace u mikrosatelitů navržených pro řád plameňáci, kdy bylo ze 47 testovaných párů primerů 8 polymorfních, tj. 17,0 %. Pro řád veslonozí byla úspěšnost 6,9 %, kdy ze 159 párů primerů jich poskytlo 11 polymorfní produkt.

8 Seznam použitých zkratek

A	adenin
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	směs deoxyribonukleosid trifosfátů
F	<i>forward</i> primer
G	guanin
L	<i>lower</i> primer
PCR	polymerázová řetězcová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
R	<i>reverse</i> primer
SSRs	repetice jednoduchých sekvencí (<i>Single Sequence Repeats</i>)
STRs	krátké tandemové repetice (<i>Short Tandem Repeats</i>)
T	tymin
Ta	teplota <i>annealingu</i>
U	<i>upper</i> primer
VNTRs	variabilní počet tandemových repetit (<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>)

9 Použitá literatura

Barlow EJ, Telford A, Cavers S (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*, preprint.

Bennett P (2000): Demystified... Microsatellites. *Molecular Pathology* 53, 177-183.

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).

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 Resource* 4, 707-709.

Campbell NA, Reece JB (2006): Biologie. Computer Press, Brno.

Dai Y, Zhou X, Fang W, Lin Q, Chen X (2013): Development and cross-species transferability of 23 microsatellite markers from the vulnerable Chinese Egret (*Egretta eulophotes*) using 454 sequencing. *Conservation Genetics Resources* 5, 1035-1038.

Dakin EE, Avise JC (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504-509.

Dearborn DC, Hailer F, Fleischer RC (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* 8, 1399-1401.

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

de Ponte Machado M, Feldheim KA, Sellas AB, Bowie RCK (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics* 10, 1033-1036.

Duffie C, Glenn TC, Hagen C, Parker P (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources* 8, 625-627.

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

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

- Faircloth BC, Ramos A, Drummond H, Gowaty PA (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxii*). *Conservation Genetics* 1, 159-162.
- Fike JA, Devault TL, Rhoades OE (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* 9, 1183-1185.
- Flegr J (2009): Evoluční biologie, 2. opravené a rozšířené vydání. Academia, Praha.
- Gaisler J, Zima J (2007): Zoologie obratlovců, 2. přepracované vydání. Academia, Praha.
- Geraci J, Gaillard M, Bechnet A, Cezilly F, Wattier RA (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- He PL, Wan QH, Fang SG, Xi IM (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics* 7, 157-160.
- Hickman CR, Peters MB, Crawford NG, Hagen G, Glenn TC, Somers CM (2009): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* 8, 1439-1441.
- Hill A, Green MC (2011): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* 3, 13-15.
- Huang X, Zhou X, Chen M, Fang W, Chen X (2010): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics* 11, 1211-1214.
- Huang Y, Zhou L (2011): Screening and application of microsatellite markers for genetic diversity analysis of Oriental White Stork (*Ciconia boyciana*). *Chinese Birds* 2, 33-38.
- Hudec K, Balát F, Černý V, Černý W, Ferienc O, Folk Č, Formánek J, Gaiser J, Hachler E, Hanzák J, Havlín J, Hora J, Chalupský J, Klíma M, Klůz Z, Kožená I, Kux Z, Matoušek B, Mošanský A, Pelz P, Ryšavý B, Šťastný K, Toufar J, Veselovský V (1994): Ptáci - Aves, Díl I. Academia, Praha.
- Hudec K, Černý W (1972): Fauna ČSSR, Ptáci 2, Academia, Praha.
- Chang Q, Coa FH, Zhu LF, Zhang BW, Zhou KY (2005): Microsatellite variation and genetic diversity in the black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* in the lower reaches of Yangtze river. *Acta Zoologica Sinica* 51, 657-663.
- Chang Q, Xie Z, Li Q, Zhou K (2009): Microsatellite loci developed for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross amplifications in Ardeidae. *Conservation Genetics* 10, 1537-1539.

Chapuis MP, Estoup A (2007): Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Ecology and Evolution* 24, 621-631.

Iqbal M, Ridwan A, Takari F, Mulyono H (2008): Rediscovery of a Milky Stork *Mycteria cinerea* breeding colony in South Sumatra province, Indonesia, *Bird to Watch* 10, 62-66.

Ji YJ, Liu YD, Ding ChQ, Zhang DX (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4, 615-617.

Kapil R, Sawyer GM, Preston L, Benjamin RC (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.

Kůs E, Pflieger V (2000): Svět vzácných zvířat na přelomu tisíciletí, Graint, Praha.

Lei ChZ, Fan GL, Zhang ID, Qui RB, Chen H (2005): Genetic polymorphism in a cultured population of the crested ibis *Nipponia nippon*. *Acta Zoologica Sinica* 51, 650-656.

Lai Y, Sun F (2003): The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution* 20, 2123-2131.

Málková B (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982): Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

McGuire HL, Noor MAF (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes* 2, 170-172.

Mercer DM, Haig SM, Mullins TD (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources* 2, 119-121.

Morris-Pocock JA, Taylor SA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources* 10, 404-408.

Myers P, Espinosa R, Parr CS, Jones T, Hammond GS, Dewey TA (2014): *Mycteria cinerea*. Navštíveno dne 21. 3. 2014 na http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Mycteria_cinerea/classification/

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi M I, Vencovsky R (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294-307.

Piertney SB, Goostrey A, Dallas JF, Carss DN (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology* 7, 138-140.

Preston EL (2005): Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Dizertační práce (Dep. In: University of North Texas).

Santos MS, Concalves EC, Barbosa MSR, Silva A, Schneider MPC (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber*-Threskiornithidae-Aves). *Molecular Ecology Notes* 6, 307-309.

Sawyer GM, Benjamin RC (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes* 6, 677-679.

Shephard JM, Galbusera P, Hellemans B, Jusic A, Akhandaf Y (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics* 10, 1525-1528.

Snustad DP, Simmons MJ (2012): Genetics. Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc., Singapore.

Šťastný K, Bejček V, Hudec K (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros, Praha.

Tomasulo-Seccomandi AM, Schable NA, Bryan AL Jr, Brisbin IL Jr, del Lama SN, Glenn TC (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3, 563-566.

Taylor SA, Morris-Pocock JA, Sun Z, Friesen VL (2009): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151, 525-528.

Van den Bussche RA, Harmon SA, Baker RJ, Bryan AL Jr, Rodgers JA Jr, Harris MJ, Brisbin IH Jr (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the wood stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 116, 1083-1092.

Vergnaud G, Deneud F (2000): Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Research* 10, 899-907.

Walsh P S, Fildes N J, Reynolds R (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus VWA. *Nucleic Acids Research*, 24, 2807-2812.

Wang H, Lou X, Zhu Q, Huang Y, Zhou L, Zhang B (2011): Isolation and Characterization of Microsatellite DNA Markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science* 28, 606-608.

Wilson R (2008): Sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) – Modern samples. Summer Project. Massey University, Albany.

Yeung CKL, Hsu YC, Yao CT, LI SH (2009): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics* 10, 1081-1084.

Zane L, Bargelloni L, Paternello T (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.

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