

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalárska práca**

**Olomouc 2012**

**Andrea Sláviková**

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



**Analýza vybraných polymorfných *cross-species* mikrosatelitov  
pre determináciu paternity u takatry tmavej  
(*Scopus umbretta*)**

Bakalárska práca

**Andrea Sláviková**

Študijný program: Biológia

Študijný odbor: Molekulárna a bunková biológia

Forma štúdia: Prezenčná

**Olomouc 2012**

**Školiteľ: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**

Čestne prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne počas bakalárskeho štúdia pod odborným vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. a s použitím literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa

.....

Touto cestou by som chcela poďakovať RNDr. Petrovi Nádvorníkovi, Ph.D. za poskytnutie odborných rád dôležitých pre moju prácu v laboratóriu a pri písaní bakalárskej práce, za jeho čas, trpezlivosť, zodpovedanie všetkých otázok a poskytnutie študijných materiálov. Taktiež ďakujem aj svojim kolegyniam za praktické rady.

## Súhrn

Táto bakalárska práca sa zameriava na hľadanie polymorfných mikrosatelitov u druhu takatra tmavá, ktoré budú ďalej využité k určeniu paternity u tohto druhu. Metódou *cross-species* PCR amplifikácie som otestovala všetkých 386 mikrosatelitov, ktoré sú známe od príbuzných radov: veslonožce, brodivce, plameniaky, potáplice, potápky a takisto som testovala aj niektoré mikrosatelity od nepríbuzných radov, konkrétne tučniaky, zúbkozobce a bahniaky.

Teoretická časť obsahuje informácie o typoch repetícií so zameraním na mikrosatelity, ich vznik, vývoj a využitie. V praktickej časti som analyzovala všetky mikrosatelity.

Celkovo som našla 23 polymorfných mikrosatelitov s počtom aliel v rozmedzí od 2 do 5. Priemerný počet aliel na lokus je 2,43. Zo všetkých primerov sa najlepšie amplifikovali práve mikrosatelity z radov Pelecaniformes a Ciconiiformes.

Z údajov, ktoré som získala v praktickej časti je podľa tradičného systému takatra priama príbuzná s radom veslonožce a podľa amplifikovaných polymorfných mikrosatelitov je vzdialenejšia príbuzná s brodivcami a plameniakmi. Podľa nového systému je takatra bližšia príbuzná s pelikánmi a veslonožcami, vzdialenejšia príbuzná s bocianmi, brodivcami a plameniakmi a veľmi vzdialená príbuzná z faetónmi.

## Summary

This bachelor thesis is focused to find polymorphic microsatellites in Hamerkop, which will use in determination of paternity in this species. Using cross-species PCR amplification I tested all primers known in related orders of birds: Pelecaniformes, Ciconiiformes, Phoenicopteriformes, Gaviiformes and Podicipediformes, and similarly I tested several microsatellites from unrelated orders Sphenisciformes, Anseriformes and Charadriiformes.

The theoretical section contains information about the types of repeats focused on microsatellites, their origin, development and utilization. In the practical part I analysed all microsatellites.

Generally, I found 23 polymorphic microsatellites and their number of alleles ranged from 2 to 5. The average number of alleles per locus is 2.43. From all of primers the best amplified microsatellites are from Pelecaniformes and Ciconiiformes.

The data that I obtained in the practical part suggest that Hamerkop is direct relative of order Pelecaniformes and also by amplified polymorphic microsatellites is close relative of Ciconiiformes and Phoenicopteriformes in traditional system. According to the new system is Hamerkop relative of order Pelecaniformes and Phalacrocoraciformes, distant relative of Ciconiiformes, Ardeiformes and Phoenicopteriformes and very distant relative of Phaethontiformes.

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	7
<b>2 Ciele práce</b> .....	8
<b>3 Literárny prehľad</b> .....	9
3.1 Problematika taxonomického zaradenia takatry tmavej ( <i>Scopus umbretta</i> ) .....	9
3.2 Rad veslonožce (Pelecaniiformes) .....	10
3.2.1 Čeľad' takatrovité (Scopidae).....	11
3.2.2 Takatra tmavá.....	11
3.3 Mímopárové správanie a analýza paternity vtákov .....	14
3.4 Repetitívne sekvencie DNA .....	15
3.5 Tandemové repetície .....	16
3.5.1 Satelity .....	16
3.5.2 Minisatelity .....	16
3.5.3 Mikrosatelity .....	17
3.5.3.1 Vývoj a mutácie mikrosatelitov .....	18
3.5.3.2 Hľadanie nových mikrosatelitov .....	19
3.5.3.3 <i>Cross-species</i> amplifikácia mikrosatelitov .....	19
3.5.3.4 Vtáky a mikrosatelity .....	20
3.6 Využitie mikrosatelitov .....	21
3.7 Polymerázová reťazová reakcia .....	21
3.7.1 Rozbor produktov PCR reakcie .....	23
3.7.2 Sporná analýza mikrosatelitových produktov PCR reakcie.....	23
<b>4 Materiál a metódy</b> .....	25
4.1 Biologický materiál .....	25
4.2 Izolácia genomickej DNA pre PCR amplifikáciu .....	25
4.3 Testovanie konkrétnych mikrosatelitových markerov prostredníctvom <i>cross-species</i> PCR amplifikácie u takatry tmavej ( <i>Scopus umbretta</i> ).....	26
4.3.1 PCR amplifikácia mikrosatelitov .....	30
4.3.2 Spracovanie PCR produktov .....	31
4.4 Zoznam použitých chemikálií .....	34
4.5 Použité roztoky .....	35
4.6 Vybavenie laboratória .....	38
<b>5 Výsledky</b> .....	39
<b>6 Diskusia</b> .....	49
<b>7 Záver</b> .....	55
<b>8 Zoznam skratiek</b> .....	56
<b>9 Použitá literatúra</b> .....	57

## 1 Úvod

Mikrosatelity predstavujú tandemové repetitívne nekódujúce sekvencie DNA. Dĺžka opakujúceho sa motívu v sekvencii mikrosatelitu je 1 – 6 párov báz. Tieto sekvencie sú známe u všetkých eukaryotických organizmov a sú rozptýlené v celom genóme. Vo fylogenetických štúdiách sa najviac uplatnili práve mikrosatelity ako vhodné markery a to vďaka tomu, že sa dedia podľa Mendelových zákonov a dajú sa ľahko sledovať v populáciách. Taktiež sa začali využívať aj v populačnej genetike vtákov a to nie iba v určovaní paternity.

Pre takatru tmavú (*Scopus umbretta*) ešte doteraz neboli navrhnuté žiadne mikrosatelity, preto som vo svojej bakalárskej práci mala nájsť polymorfne mikrosatelity pomocou *cross-species* PCR amplifikácie známych mikrosatelitov od príbuzných druhov z radov brodivce, veslonožce, plameniaky, potáplice, potápky a niekoľko mikrosatelitov od nepríbuzných druhov.



## 2 Ciele práce

1. Vypracovanie rešerše na tému bakalárskej práce s použitím zdrojov obsahujúcich využitie mikrosatelitov pre štúdium vtákov.
2. PCR amplifikácia DNA takatry tmavej využitím *cross-species* primerov pre mikrosatelity od hlavných príbuzných druhov z radov brodivce (Ciconiiformes), veslonožce (Pelecaniformes), plameniaky (Phoenicopteriformes), potáplice (Gaviiformes), potápky (Podicipediformes) a nepríbuzných druhov z radov bahniaky (Charadriiformes), tučniaky (Sphenisciformes) a zúbkozobce (Anseriformes).
3. Zistiť prítomnosť a optimalizovať podmienky PCR amplifikácie polymorfných mikrosatelitov – teplotu annealingu a upraviť dobu separácie PCR produktov na polyakrylamidovom géli s cieľom zistiť počet ich aliel.

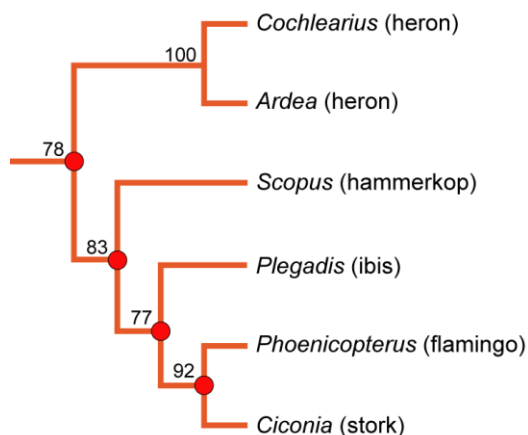
### 3 Literárny prehľad

#### 3.1 Problematika taxonomického zaradenia takatry tmavej (*Scopus umbretta*)

Problematika taxonomického zaradenia takatry tmavej má dlhú históriu. Dodnes nie je presne známe, či tento druh patrí do radu brodivcov (Ciconiiformes) alebo veslonožcov (Pelecaniformes).

Čeľaď Scopidae bola prvotne priradená do radu Ciconiiformes (obr. 1), na základe pozorovaní sa rozhodovalo o priradení buď ku bocianom (Ciconidae) alebo volavkám (Ardeidae). Ani po starostlivom zvážení rôznych charakteristík nebolo možné presne objasniť zaradenie k volavkám alebo bocianom. Predpokladalo sa príbuzenstvo s člnozobcom a vedci došli k záveru, že takatra a člnozobec nie sú až tak veľmi vzdialené druhy a priklonili sa k možnosti zaradenia takatry medzi bociany a volavky, ale v blízkosti člnozobca (Cowles, 1930).

**Obr. 1:** Taxonomické zaradenie takatry tmavej podľa Livezey *et al.* (2007), kde je zaradená medzi Ciconiiformes.



Pelecaniformes sú často uvádzané ako parafyletický alebo polyfyletický taxón, aj keď zdieľajú výrazné morfológické synapomorfie. Molekulárne štúdie ukázali, že fylogeneticky medzi pelikány patria aj čeľade Scopidae a Balaenicipidae so zástupcami druhu takatra tmavá a člnozobec kráľovský (*Balaeniceps rex*). Suly, kormorány a anhingy tvoria monofyletickú skupinu, faetóny a fregatky sú veľmi starobylé skupiny, čo komplikuje snahy o ich fylogenetické zaradenie (Gaisler *et Zima*, 2007).

Elektroforéza proteínov vaječného bielku naznačuje istú podobnosť s Ciconiiformes (Brown *et al.*, 1982). Analýzami boli čeľade takatrovité (Scopidae) a člnozobcovité (Balaenicipitidae) označené za monofyletické (Smith, 2010).

Podľa nového taxonomického zaradenia, tvoria samostatné rady pelikány a veslonožce. Rad pelikány obsahuje iba tri čeľade a to takatrovité, člnozobcovité a pelikánovité. Čeľade fregatovité, sulovité, anhingovité a kormoránovité patria do radu veslonožce a faetóny sú zaradované ako samostatný rad z jednou čeľadou (Kovalik *et al.*, 2010).

### **3.2 Rad veslonožce (Pelecaniiformes)**

Sú to veľké vodné vtáky, ktoré majú všetky štyri prsty na nohe spojené plávajúcou blanou. Prispôbili sa rôznym technikám lovu rýb a v súlade s tým sa vonkajším vzhľadom jednotlivé skupiny a druhy líšia (Gaisler *et Zima*, 2007).

Všetky pelikány majú mohutný zobák s pružným kožným vakom na dolnej čeľusti, do ktorého chytajú ryby. Kormorány majú silný rovný zobák s hákovitou špičkou. Suly sa vyznačujú dlhými špicatými krídlami a špicatým chvostom (Svensson *et Grant*, 2004).

Potápaním lovia ryby kormorány a anhingy, strmhlavým pádom do vody suly a faetóny, zberaním z hladiny za letu alebo paraziticky od iných vtákov fregatky (Gaisler *et Zima*, 2007). Pelikány často lovia ryby spoločne. Vtáky, jeden vedľa druhého, vytvoria polkruh a zobákmi či mávaním krídel vyhávajú ryby na plytčiny (Singer, 2008).

Hniezdia väčšinou v kolóniách na zemi alebo na stromoch a mláďatá sú nidikolné. Žijú v trópoch, subtrópoch až miernom pásme celého sveta a sú sladkovodné aj morské (Gaisler *et Zima*, 2007).

### 3.2.1 Čeľad' takatrovité (Scopidae)

Do tejto čeľade patrí iba jeden rod z jediným druhom a to takatra tmavá. Svojím vonkajším vzhľadom sa podobá na menšieho bociana, avšak má oveľa kratšie, ale mohutnejšie nohy. Prsty má spojené úzkym kožným lemom. Vzadu na hlave má výrazný chochol a zo strán sploštený zobák (Šťastný *et* Bejček, 1998).

Systematické zaradenie rodu *Scopus*:

Kmeň:	Strunovce (Chordata)
Podkmeň:	Stavovce (Vertebrata)
Trieda:	Vtáky (Aves)
Podtrieda:	Letci (Neognathae)
Rad:	Pelikány (Pelecaniformes)
Čeľad':	Takatrovité (Scopidae)
Rod:	Takatra ( <i>Scopus</i> )

### 3.2.2 Takatra tmavá

Takatra tmavá (*Scopus umbretta*, Hamerkop, kladivouš africký), bola pomenovaná Johannom Friedrichom Gmelinom v roku 1789. Je to malý vták z hmotnosťou iba 415 g. V dnešnej dobe sa veľkosť populácie pohybuje okolo 170000 až 1100000 jedincov a areál rozšírenia tohto druhu je obrovský, predstavuje 19900000 km<sup>2</sup>. Nie je migrujúcim druhom. Populačný trend je stabilný alebo narastajúci. Vyskytuje sa na troch štvrtinách územia Afriky od štátov Sudán, Čad, Mali a Nigéria v strednej Afrike a tiahne sa smerom na juh cez Keňu, Tanzániu, Zair a Zambiu až po Juhoafrickú republiku (Anonymous, 2012).

Najstaršie dôkazy o tomto druhu pochádzajú z obdobia pliocénu z južnej Afriky (del Hoyo *et al.*, 1992).

Celé telo je matne hnedé, svetlejšie na krku a veľkosťou sa pohybuje od 48 do 56 cm. Hlava je výrazne klenutá a tmavo hnedá a svojím tvarom pripomína kladivo, preto aj názov „Hamerkop“. Chvost je hnedý, na chvostových perách má päť tmavohnedých pruhov a zobák aj nohy sú výrazne čierne (Brown *et al.*, 1982).



**Obr 2:** Takatra tmavá (*Scopus umbretta*).

Zdroj: Mgr. Ján Gúgh.

Tvarom svojho zobáka sa nápadne podobá na člnozobca kráľovského (*Balaeniceps rex*) a volavčika člnozobého (*Cochlearius cochlearius*) a to práve vďaka konvergentnej evolúcii (del Hoyo *et al.*, 1992).

Takatra sa vonkajšími morfológickými znakmi podobá na volavky hrebeňovitým stredným prstom a počas svadobných tancov nápadnou chocholkou. Zadným prstom sa podobá na plameniaky, ale iné spoločné znaky s týmto radom nemá. Svojím svižným letom sa podobá sovám, počas letu je hlava čiastočne zasunutá, čo je tiež podobné s volavkami (Brown *et al.*, 1982).

Je denným vtákom, ale aktívna za svitania aj za súmraku. Obýva vodné prostredie – jazerá, veľké rieky, močiare, priehrady, sezónne zaplavované rybníky, vyskytuje sa v prostredí od lesa až po polopúšte kde je prítomná voda. Normálne sa vyskytuje v pároch, ale niekedy aj v krdľoch kde je okolo 50 jedincov a tvoria skupiny po 8-10 jedincov (Brown *et al.*, 1982).

Potravu vyhľadáva v plytkých vodách, pozdĺž nánosov piesku a na okrajoch rákosia. Živí sa hlavne organizmami radu Amphibia, napríklad mladými jedincami pazúrnatky vodnej (*Xenopus laevis*) (Brown *et al.*, 1982). Takatra dokáže loviť najväčšie dážďovky sveta dosahujúce až 7 m (Alderton, 1995).

Je čiastočne teritoriálna, dvojica obývajúca úsek rieky alebo jazera nie je veľmi agresívna na susediace druhy a ich teritória sa navzájom prekrývajú. Na teritóriu sa vyskytujú počas celého roka, pravidelne nocujú v hniezde, ale počas dažďov sa rozptýlia na rybníky v polosuchých oblastiach, kde zotrávajú aj počas výchovy mláďat dokiaľ neklesne hladina vody (Brown *et al.*, 1982).

Hniezdo takatry je najväčším hniezdom celej vtácej ríše a má zložitú štruktúru. Na hniezdo takatry sa podobá hniezdo bociana lebo je tiež tvorené veľkým množstvom materiálu a je robustné. Porovnaním týchto dvoch hniezd, hniezdo bociana je po stranách vyvýšené a následne pokryté materiálom. Hniezdo takatry je najčastejšie umiestnené vo vidlici konárov na veľkých stromoch blízko rieky a niekedy sa nachádza previsnuté nad vodou. Počas skorej fázy výstavby hniezda konáre, korene a iný vhodný materiál je umiestňovaný do vidlice stromu pokiaľ nie je tento základ dostatočne široký. Postupne sú stavané strany hniezda až sa navzájom začnú približovať a spoja sa na vrchole. Vnútoraná časť hniezda, ktorá bezprostredne obklopuje dutinu hniezda je pekne opracovaná až dohladka a pokrytá blatom. Priestor medzi materiálom nachádzajúcim sa po stranách hniezda je vyplnený blatom, takže táto časť konštrukcie je mimoriadne pevná. Hniezdo sa postupne uzatvára s výnimkou vstupnej chodby. Strecha nie je starostlivo urobená, všetky konáre a palice umiestnené na vrchole hniezda sa podobajú nánosom konárov po ustupujúcej vode. Vtáky naďalej aj po dokončení hniezda pridávajú materiál do hniezda a to aj počas inkubácie a rastu mláďat. Veľkosť hniezda sa uvádza 1 m výška a 1,5 m šírka, hniezdna komora je vzdialená 73 cm od vchodu do hniezda. Rozmery samotnej hniezdnej komory sú 50 cm šírka a 30 cm hĺbka a hniezdo je rovné až mierne prehĺbené. Vstup do hniezda je 17 cm vysoký a 22 cm široký (Cowles, 1930).

Predpokladá sa, že pôvodne sa toto hniezdo podobalo na hniezdo bociana, časom sa však hniezdo stalo vyššie a uzavreté. Impulz pre ďalšie zväčšovanie hniezda je pravdepodobne spôsobený zvykom prikladať na vrchol hniezda staré kosti, hnijúce mäso, kusy kože alebo fekálie. Tak isto sa predpokladala aj možnosť, že sa takatra živí zdochlinami, avšak to nebolo potvrdené (Cowles, 1930).

Hniezdo si stavajú vo výške od 1 po 20 metrov nad hladinou vody, občasne 5 až 10 m. Hniezdo si stavajú každoročne alebo ho využívajú niekoľko rokov. Väčšina párov má jedno až tri hniezda blízko vedľa seba, ale aktívne využívajú iba jedno.

Hniezdo stavajú samec aj samica, výstavba hniezda je dokončená za 4 až 6 týždňov. Dokončené hniezdo by malo udržať váhu dospelého muža (Brown *et al.*, 1982).

Znáška obsahuje tri až šesť vaječ, ktoré zahrievajú obaja rodičia. Inkubácia trvá približne 21 dní, ale práve vďaka tomu, že je hniezdo uzavreté je ťažké určiť aj presný deň vyliahnutia mláďat. Samica kladie vajcia koncom septembra až v októbri, ale sú známe prípady, kedy bola inkubácia zaznamenaná už v máji alebo v auguste. Obyčajne trvá dva týždne dokiaľ samica nakladie všetky vajčká. Vajcia sú sfarbené do biela až slabo ružova, ich povrch je matný. Po vyliahnutí sú mláďatá pokryté jemným perím, hlava, krk, krídla a boky sú svetlo šedé skoro až biele. Od chvosta až po lopatky je telo tmavo šedé, nohy sú ružové a po mesiaci menia farbu na šedo modrú. Mláďatá po opustení hniezda sa v nasledujúcej hniezdnej sezóne nevracajú, ale stavajú si vlastné hniezda (Cowles, 1930).

Boli pozorované prípady, kedy vtáky, či už samica so samcom alebo jedince toho istého pohlavia, kopuláciu iba napodobňovali, ale nedošlo ku kloakálnemu kontaktu (del Hoyo *et al.*, 1992).

### **3.3 Mimopárové správanie a analýza paternity vtákov**

Využitím molekulárne genetických techník došlo k novému pohľadu na systém párenia vtákov. Očakávalo sa, že vtáky sú prevažne monogamné. Približne u 90 % potomkov bola dokázaná mimopárová paternita. Dokonca aj u sociálne monogamných druhov až 11 % potomkov pochádza z mimopárových vzťahov (EPP) (Griffith *et al.*, 2002).

Mimopárová paternita je definovaná ako podiel oplodnení vyplývajúcich z kopulácie mimo sociálne väzby (Møller, 1986; Westneat *et al.*, 1990; Davies, 1991). V dôsledku prítomnosti polyandrie u samíc sa u sociálne monogamných druhov považujú za mimopárových potomkov jedince, ktoré splodil samec z inej sociálnej skupiny ako domnelý otec (Owens & Hartley, 1998). U Passeriformes sa monogamia vyskytuje iba u 14 % druhov a u ostatných 86 % druhov pravidelne dochádza k polyandrii (Griffith *et al.*, 2002).

Rozlíšenie jedincov pochádzajúcich z mimopárového párenia je čiastočne možné aj na základe vonkajších morfológických znakov a to farebnosti peria, ale dá sa aplikovať iba u niektorých druhov. Je nedostatočné pre použitie u všetkých vtáčích druhov (Birkhead *et al.*, 1988).

Lepšie využitie má allozýmová variabilita. Je rozšírená u viacerých druhov a variabilita poskytuje vysokú istotu pre vylúčenie alebo potvrdenie samca ako genetického otca mláďaťa (Griffith *et al.*, 2002).

Moderné štúdium je založené takmer výlučne na odhadoch mimopárovej paternity, ktoré používajú DNA techniky ako genotypovanie mikrosatelitov a jednolokusový alebo multilokusový fingerprinting (Griffith *et al.*, 2002).

### **3.4 Repetitívne sekvencie DNA**

Chromozómy všetkých eukaryotických organizmov obsahujú mnoho sekvencií DNA, ktoré sa opakujú niekedy až miliónkrát. DNA obsahujúca takéto opakujúce sa sekvencie je repetitívna DNA a tvorí 15 – 80 % genómu eukaryotických organizmov (Snustad *et Simmons*, 2009).

Hustota génov v genóme eukaryotických organizmov je veľmi variabilná, čo je spojené s konkrétnym druhom. U nižších eukaryot je hustota génov vyššia a u vyšších eukaryot je hustota génov nižšia v dôsledku rozdielnosti vo veľkostiach genómov. Ako dôvod nižšej hustoty génov vo väčších eukaryotických genómoch je práve prítomnosť značného množstva repetitívnej DNA (Snustad *et Simmons*, 2009).

Repetitívna DNA je označovaná aj ako satelitná DNA, pomenovaná podľa prvej izolácie diferenciacnou centrifugáciou, pretože je viditeľná ako „satelitný“ prúžok v centrifugačnej skúmavke (Campbell *et Reece*, 2006).

Celková repetitívna DNA sa rozdeľuje na satelitnú a rozptýlenú repetitívnu DNA. Satelitná DNA je klasifikovaná do troch typov. Rozlišujeme satelitnú, minisatelitnú a mikrosatelitnú DNA (Campbell *et Reece*, 2006).

Eukaryotický genóm taktiež obsahuje veľké množstvo rozptýlenej repetitívnej DNA. Opakujúce sa jednotky tohto typu DNA nenasledujú jedna za druhou, ale sú



roztrúsené v genóme. Jeden úsek môže byť obyčajne dlhý sto až tisíc párov báz a rozptýlené jednotky sú si podobné, ale nie úplne identické. Rozptýlená repetitívna DNA tvorí 25 – 40 % genómu cicavcov. Väčšina týchto sekvencií predstavuje transpozóny, mobilné genetické elementy (Campbell *et* Reece, 2006).

### **3.5 Tandemové repetície**

Tandemová repetitívna DNA sa nachádza v rôznom množstve u rôznych druhov. U cicavcov tvorí asi 10 – 15 % genómu. Počet opakujúcej sa jednotky môže byť až stotisíc. Opakujúce sa úseky u mikrosatelitov sú dlhé 2 – 6 párov báz. Nukleotidové zloženie tandemovo repetitívnej DNA je často dostatočne odlišné od ostatnej bunkovej DNA (Campbell *et* Reece, 2006).

#### **3.5.1 Satelity**

Niektoré sekvencie opakujúce sa viac ako miliónkrát sa nazývajú satelitné DNA sekvencie. Opakujúce sa jednotky sú zvyčajne niekoľko 100 bp dlhé a mnoho kópií je zoradených za sebou a tandemovo sa opakujú (Bolsover *et al.*, 2004). Satelitné sekvencie DNA obyčajne nie sú exprimované, čiže nekódujú RNA alebo proteínové produkty (Snustad *et* Simmons, 2009).

#### **3.5.2 Minisatelity**

Prvýkrát boli minisatelity popísané pred niekoľkými rokmi a to v genóme človeka (Wyman *et* White 1980).

Úseky minisatelitovej DNA, zatiaľ neznámych funkcií, môžu byť dlhé až 20000 bp a často sa nachádzajú v blízkosti koncov chromozómov v oblasti telomér. Tandemovo opakujúce sa jednotky majú približne 25 bp (Bolsover *et al.*, 2004). Minisatelity sú bohaté na bázy GC so silnou vláknovou asymetriou (Vergnaut *et* Denoeud, 2000).

Minisatelity poskytujú vysoko polymorfne multialelické markery (Nakamura *et al.*, 1987). Niektoré sú súčasťou otvoreného čítacieho rámca a môžu alebo nemusia vykazovať polymorfizmus v populácii človeka (Bois *et al.*, 1999). Minisatelity lokalizované na 5' konci vlákna DNA sa zúčastňujú regulácie transkripcie (Kennedy *et al.*, 1995).

### 3.5.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity sú krátke, tandemovo sa opakujúce jednoduché sekvenčné motívy o dĺžke 2 – 6 bp. Vyskytujú sa v kódujúcich aj nekódujúcich oblastiach. Sú charakterizované vysokou mutačnou rýchlosťou (Zima *et al.*, 2004). Sú rozšírené v eukaryotickom aj prokaryotickom génóme (Field *et al.*, 1998; Tóth *et al.*, 2000).

Mikrosatelity nie sú pravidelne rozptýlené v rámci jedného génómu a to vďaka rozdielom vo frekvenciách v ich kódujúcich a nekódujúcich sekvenciách (Arcot *et al.*, 1995; Wilder *et al.*, 2001). Distribúcia mikrosatelitov nie je iba odrazom základného zloženia génómu, ale taktiež mechanizmy reparácie DNA majú dôležitú úlohu v stanovení distribúcie mikrosatelitov u rôznych druhov (Oliveira *et al.*, 2006). U mikrosatelitov, ktoré majú tendenciu tvoriť zhluky, dochádza k nenáhodným distribúciám v sekvenciách menších ako 15 kb, čo bolo preukázané u *Drosophila melanogaster* (Bachtrog *et al.*, 1999).

Homozygotný lokus mikrosatelitu má rovnaký počet opakovaní na oboch homologických chromozómoch. Heterozygotný lokus mikrosatelitov má iný počet opakovaní na každú alelu. Avšak v rovnakom lokuse v populácii zvyčajne obsahuje niekoľko aliel s rozdielnym počtom repetícií, čo znamená, že mikrosatelity sú veľmi užitočné pre rozlíšenie jednotlivcov (Oliveira *et al.*, 2006).

Najfrekventovanejší typ mikrosatelitov je tvorený dinukleotidovým motívom, ale vyskytujú sa aj tri- a tetranukleotidové motívy. U cicavcov sa najčastejšie vyskytujú dinukleotidové mikrosatelity so sekvenciou AC, ktorá sa vyskytuje až dvakrát častejšie ako repetície AT a trikrát častejšie ako sekvencia AG. Z trinukleotidov sú najfrekventovanejšie CAG a AAT (Zima *et al.*, 2004).

### 3.5.3.1 Vývoj a mutácie mikrosatelitov

Aplikácia mikrosatelitov je do značnej miery uľahčená využitím EST sekvencií. EST sekvencie predstavujú úseky mRNA a sú zástupcami prepisovanej časti genómu a tiež môžu obsahovať mikrosatelity. Hoci mikrosatelity spojené z EST sekvenciami sú menej polymorfné ako iné mikrosatelity, ich význam sa zvyšuje tým, že sú medzidruhovo prenosné medzi viacerými taxónmi a sú využiteľné ako funkčné markery pre definíciu rôznych vlastností určených génmi (Gutierrez *et al.*, 2005; Pashley *et al.*, 2006; Slate *et al.*, 2007). Sú dlhé približne okolo 20 bp (La Rota *et al.*, 2005).

Na vysvetlenie vysokej rýchlosti mutácií mikrosatelitov bolo navrhnutých niekoľko mechanizmov pozostávajúcich z chýb počas rekombinácie, nerovnomerného *crossing-overu* a skĺznutia DNA-polymerázy počas replikácie a reparácie DNA (Strand *et al.*, 1993). Za hlavný zdroj vysokej premenlivosti sa považuje skĺznutie nukleotidového reťazca počas replikácie. Preto sa jednotlivé alely navzájom líšia svojou dĺžkou a môžu byť ľahko separované elektroforézou (Zima *et al.*, 2004).

Nerovnomerný *crossing-over* môže spôsobiť výrazné zmeny, ako napríklad stratu alebo zisk veľkého počtu repetícií. Pokiaľ sú mikrosatelity prítomné, tak sa vlákno tvorí počas synapsie, čo znamená, že iba nie rovnako dlhé časti v každom chromozóme sa budú vymieňať a jeden chromozóm prijme väčší fragment v dôsledku väčšieho počtu repetitívnych sekvencií a homologický chromozóm prijme úsek s menším počtom repetícií. Skĺznutím DNA-polymerázy počas replikácie a reparácie DNA môže dôjsť k dočasnému odlúčeniu jedného vlákna DNA od druhého vlákna a potom dôjde k rýchlemu znovu spojeniu týchto vlákien v rozdielnych pozíciách (Oliveira *et al.*, 2006).

Poruší sa správne párovanie nukleotidov v mieste repetície a pokračuje predlžovanie nového vlákna. Narastá počet opakujúceho sa motívu repetície a takisto môže dôjsť k delícii repetície (Hancock, 1999). Skĺznutie môže destabilizovať mikrosatelity lebo neexistuje účinný mechanizmus pre reparáciu DNA vlásieniek alebo z dôvodu zmeny v DNA-polymeráze alebo jej kofaktorov, čo má za následok nárast skĺznutí (Oliveira *et al.*, 2006).

Počet opakovaní je kľúčovým faktorom určenia evolučnej dynamiky mikrosatelitov, čo je veľmi dôležité pre zistenie parametrov ovplyvňujúcich dĺžku repetícií. Skĺznutie DNA sa v najjednoduchšom modeli vývoja mikrosatelitov považuje za symetrický proces a preto pridaný počet opakovaní je v priemere rovnaký ako počet odstránených repetícií (Oliveira *et al.*, 2006). Z čoho vyplýva, že druhy s krátkymi mikrosatelitmi (napr. *Drosophila melanogaster*) by mali mať nižší pomer mutácií ako druhy s dlhšími mikrosatelitmi (Kruglyak *et al.*, 1998). U odlišných pohlaví sa líši mutačná rýchlosť mikrosatelitov a rozdiely sa môžu vyskytnúť aj u tých mikrosatelitov, kde je rôzny počet CG báz (Anmarkrud *et al.*, 2008).

Vďaka vysokému pomeru mutácií u mikrosatelitov je predpoklad, že kódujúce oblasti majú nízku hustotu mikrosatelitov pretože ak nie sú tieto oblasti výrazne pozmenené, môže dôjsť ku strate funkčnosti (Oliveira *et al.*, 2006).

### **3.5.3.2 Hľadanie nových mikrosatelitov**

Hlavnou nevýhodou mikrosatelitov je, že musia byť najprv identifikované vhodné primery pre ich amplifikáciu. Vzhľadom k tomu, že väčšina mikrosatelitov sa nachádza v nekódujúcich oblastiach genómu, ktorý je charakteristický vysokou frekvenciou nukleotidových substitúcií, je nutné jednotlivé lokusy izolovať *de novo* pre druhy, u ktorých ešte mikrosatelity neboli skúmané. Samotná izolácia mikrosatelitov zahŕňa digesciu DNA jednou alebo viacerými restriktázami, klonovanie do plazmidového vektoru alebo ligáciu špecifických adaptérov, hybridizáciu so značenou oligonukleotidovou sondou ako napríklad (CA)<sub>n</sub>, výber a sekvenovanie pozitívnych klonov a vyhľadávanie nových primerov. U intenzívne študovaných druhov je známych mnoho mikrosatelitov, ktoré sa dajú použiť aj na analýzu príbuzných druhov (Zima *et al.*, 2004).

### **3.5.3.3 Cross-species amplifikácia mikrosatelitov**

*Cross-species* amplifikácia mikrosatelitov je veľmi dôležitá metóda pre uľahčenie využitia týchto markerov, pretože sa znižujú náklady pri práci s taxónmi s nízkou frekvenciou mikrosatelitov alebo z ktorých je problém mikrosatelity izolovať.

Prenosnosť mikrosatelitov medzi príbuznými druhmi je daná podľa homologickej povahy sekvencie DNA so sprievodnými oblasťami mikrosatelitov. Ale amplifikácia klesá s narastajúcimi genetickými odlišnosťami medzi druhmi (Primmer *et Merilä*, 2000).

Využitie techniky *cross-species* amplifikácie mikrosatelitov sa ukázalo veľmi výhodné najmä u vtákov. Podľa štúdie Primmer *et al.* (1997), vtáčí genóm obsahuje asi 10x menej mikrosatelitov ako genóm človeka.

Pokrok mikrosatelitov bol do značnej miery ovplyvnený najmä vysokými nákladmi na rozvoj špecifických primerov, ktoré boli navrhnuté iba pre jeden druh, ale môžu byť taktiež použité aj na iných druhoch rovnakého rodu (Isagi *et Suhandono*, 1997; Cipriani *et al.*, 1999).

Je jasné, že úspech *cross-species* amplifikácie závisí aj od evolučnej vzdialenosti medzi druhmi. Aj niekoľko štúdií preukázalo, že mikrosatelity izolované z viacerých druhov, amplifikovali zodpovedajúce polymorfne lokusy u blízkych druhov a nie u druhov vzdialených (Primmer *et al.*, 1996).

#### **3.5.3.4 Vtáky a mikrosatelity**

Vtáčí genóm skrýva oveľa menej mikrosatelitov ako väčšina cicavcov. Najviac sú zastúpené dinukleotidové motívy (Hamada *et al.*, 1982; Manor *et al.*, 1988). U cicavcov sú výnimkou netopiere, ktoré majú jeden z najmenších genómov u cicavcov. (Van den Bussche *et al.*, 1995).

Mikrosatelity sa spravidla vyskytujú menej často u vtákov, porovnaním s ostatnými cicavcami a na rozdiel od mikrosatelitov cicavcov, mikrosatelity vtákov sa neobjavujú v asociácii s krátkymi rozptýlenými repetitívnymi sekvenciami (SINES) (Primmer *et al.*, 1997).

Bez ohľadu na dôvod nižšej frekvencie mikrosatelitov u vtákov, tento fakt bude obmedzovať schopnosť vývoja genetických máp bohatých na markery v rozsahu, ktorý bol dosiahnutý u cicavcov (Economou *et al.*, 1990).

Odhadovaný počet mikrosatelitov v genóme vtákov je 31000, čo predstavuje jeden mikrosatelit na 39 kb (Primmer *et al.*, 1997). Nízka hustota vtáčích mikrosatelitov taktiež vyžaduje použitie obohatených markerov, aby sa zabránilo preverovaniu rozsiahleho množstva klonov z genómových databáz (Armour *et al.*, 1994).

### 3.6 Využitie mikrosatelitov

Možnosti aplikácie mikrosatelitov sú veľké a spektrum ich využitia sa stále rozširuje. Vďaka vysokej početnosti a celogenómovej distribúcii nachádzajú široké uplatnenie predovšetkým v mapovaní genómu, v dôsledku ich vysokej premenlivosti sa často používajú aj vo forenzných analýzach, individuálnom typovaní jedincov v populácii, určovaní paternity, veľkosti a štruktúry populácie, genetickej premenlivosti, toku génov (mikrosatelity špecifické pre chromozóm Y umožňujú porovnať mieru migrácie samcov a samíc) a v ochrane druhov. V súčasnej dobe sa stále viac uplatňujú aj v štúdiu genetických procesov (Zima *et al.*, 2004). Takáto široká možnosť využitia mikrosatelitových markerov je najmä vďaka tomu, že sú kodominantné a multialelické, vysoko reprodukovateľné, majú vysoké rozlíšenie a ich štúdium je založené na PCR amplifikácii (Oliveira *et al.*, 2006). Mikrosatelity sa ľahko klonujú. Charakterizujú a zobrazujú dôležitý polymorfizmus, vďaka variáciám v počte opakujúcich sa jednotiek. Tento polymorfizmus je dostatočne stabilný pre použitie v genetických analýzach (Hearne *et al.*, 1992).

### 3.7 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je jednoduchá technika, ktorá umožňuje amplifikovať *in vitro* špecifický úsek DNA vo veľkom množstve, pričom množstvo pôvodnej vzorky DNA môže byť extrémne malé. Prvé úvahy o vzniku polymerázovej reťazovej reakcie siahajú až do obdobia kedy bola objavená DNA-polymeráza (Zima *et al.*, 2004).

Podstatou PCR je cyklicky sa opakujúca enzýmová syntéza nových reťazcov vybraných úsekov dvojreťazcovej DNA v smere 5'→3' prostredníctvom DNA-polymerázy. Študovaný úsek nukleotidovej sekvencie je vymedzený pripojením dvoch

primerov, ktoré sa viažu na protíľahlé reťazce DNA tak, že ich 3'- konce smerujú proti sebe. Po pridaní DNA-polymerázy a nukleotidov prebieha syntéza nových vlákien na nových matricových reťazcoch protismerne. K syntéze DNA sa používajú termostabilné polymerázy izolované z termofilných mikroorganizmov, napríklad *Taq* DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus*. Odoláva teplotám, pri ktorých dochádza k denaturácii DNA. Práve to umožňuje, aby syntéza DNA prebiehala opakovane formou cyklov. PCR je proces, v ktorom sa v závislosti od teploty reakčnej zmesi pravidelne striedajú tri kroky, počas ktorých prebiehajú rozdielne deje s rôznymi teplotnými nárokmi:

**Denaturácia** – roztok sa zahreje na teplotu 92 – 95 °C a dochádza k disociácii fragmentov dsDNA na jednotlivé reťazce.

**Ochladenie** – dochádza k naviazaniu primerov („annealing“). Tento krok je najdôležitejší, lebo úspech celej PCR závisí na správnom naviazaní primerov. Teplota sa líši v závislosti od dĺžky primerov alebo od zloženia báz a obyčajne sa pohybuje medzi 45 – 60 °C, ale v kritických situáciách to môže byť 37 až 72 °C. Trvanie prvých dvoch krokov sa pohybuje od 15 do 60 sekúnd, ale obvykle je to 30 sekúnd.

**Extenzia** – syntetizujú sa nové reťazce nadväzujúce na 3' - konce primerov. Táto reakcia je katalyzovaná *Taq* DNA-polymerázou pri teplote 72 °C. Pri tejto teplote sú voľné nukleotidy začleňované do vznikajúceho reťazca rýchlosťou 35 báz za sekundu. Samotná dĺžka trvania tejto fázy závisí na dĺžke syntetizovaného fragmentu.

Reakcia sa uskutočňuje v termocykléroch, kde sa teplota mení automaticky v naprogramovaných časových intervaloch. Postupným opakovaním tohto procesu sa exponenciálne ( $2^n$ ,  $n$  = počet cyklov) zvyšuje počet kópií vybraného úseku DNA. Ide o spôsob klonovania DNA. Pre získanie požadovaného produktu, špecificity a výťažku je dôležitá koncentrácia jednotlivých zložiek reakčnej zmesi. Roztok pre PCR obsahuje vzorku DNA, zmes všetkých štyroch nukleotidov dNTPs – dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dva primery, *Taq* DNA-polymerázu, pufor,  $MgCl_2$ , ktorý je dôležitý pre vytvorenie komplexu z jednotlivými 2'-deoxyribonukleozid-5'-fosfátmi a deionizovanú vodu. Počet cyklov je 25 – 35. Vyšším počtom cyklov môže dôjsť ku vzniku nešpecifických produktov (Šmarda *et al.*, 2005).

Väčšinou sa na koniec posledného cyklu pridá niekoľko minút trvajúca finálna extenzia pri 72 °C, ktorá slúži k tomu, aby sa vylúčil výskyt krátkych neúplných fragmentov (Zima *et al.*, 2004).

### 3.7.1 Rozbor produktov PCR reakcie

Výsledkom PCR sú amplikóny – úseky DNA definovanej dĺžky a veľkosti. Ich prítomnosť dokážeme elektroforézou a vizualizáciou v polyakrylamidovom alebo agarózovom géli, striebrom alebo etídiumbromidom (Šmarda *et al.*, 2005).

Nukleové kyseliny vďaka zápornému náboju sa v elektrickom poli budú pohybovať smerom k anóde. Rýchlosť migrácie fragmentov závisí od ich veľkosti, kratšie fragmenty sa pohybujú rýchlejšie ako väčšie fragmenty (Zima *et al.*, 2004).

### 3.7.2 Sporná analýza mikrosatelitových produktov PCR reakcie

#### Alelová homoplázia

Homoplázia je jav známy u organizmov, kedy dve alely nachádzajúce sa v jednom lokuse sú si identické svojou dĺžkou, ale odlišujú sa pôvodom, pretože ich vývoj bol konvergentný (Estoup *et al.*, 2002).

Formujúci činiteľ homoplázie je výrazne ovplyvnený molekulárnou štruktúrou kľúčových sekvencií mikrosatelitov. Homoplázia u mikrosatelitov nepredstavuje významný problém pre viacero typov analýz populačnej genetiky. Veľké množstvo dĺžkovej variability mikrosatelitových lokusov sa často kompenzuje evolúciou homoplázie. Situácia, kedy veľkosť homoplázie môže byť problematická, zahŕňa vysokú mutačnú rýchlosť a veľkosť populácie (Estoup *et al.*, 2002).

Alely vykazujúce homopláziu sa rozdeľujú na dva typy. Prvý typ týchto aliel je možné zaznamenať pomocou metódy jednoreťazcového konformačného polymorfizmu (SSCP). Tieto alely sa od seba odlišujú v sekvenciách, ale ich dĺžka je rovnaká (Angers *et al.*, 2000). Druhý typ aliel, u ktorých dochádza k homoplázii sa vyznačuje tým, že má rovnako dlhé sekvencie, ktoré ale vznikli rôzne (Anmarkrud *et al.*, 2008).



### Nulové alely

Vysoko polymorfne mikrosatelity, ako už bolo vyššie uvedené, sú široko využiteľné v genetických analýzach, ale ich nevýhodou je prítomnosť nulových aliel, ktoré sa neamplifikujú a neposkytujú PCR produkt (Dakin *et Avise*, 2004). Uvažovalo sa, ako môžu nulové alely v mikrosatelitoch ovplyvniť molekulárne analýzy určovania rodičovstva. Správne určenie prítomnosti nulovej alely je dôležitým faktorom pre analýzu paternity. Tieto alely môžu byť príčinou chybného vylúčenia otcovstva, kedy heterozygot s nulovou alelou je chybné určený za homozygota bez nulovej alely (Callen *et al.*, 1993).

Vďaka konkurenčnej povahe PCR sa krátke alely amplifikujú efektívnejšie ako dlhé alely, ale iba kratšia alela môže byť zistená u heterozygota. Nulové alely vzniknuté rozdielnou amplifikáciou sa označujú ako „*partial nulls*“ alebo čiastočne nulové alely, lebo môžu byť viditeľné použitím viacerých vzoriek alebo upravením kontrastu (Dakin *et Avise*, 2004).

Biologické faktory ako Wahlundov efekt alebo inbríding, môžu spôsobiť výrazné odchýlky v početnosti genotypov v pomere ku Hardy – Weinbergovmu zákonu, ktoré by mohli byť nesprávne ako dôkaz nulových aliel (Chakraborty *et al.*, 1992).

### Stutter bandy

PCR amplifikáciou tetranukleotidových repetícií sú produktom bandy o 4 bp kratšie ako hlavné alelové bandy, označujú sa ako „*stutter bands*“. Sekvenčnou analýzou hlavných bandov aj stutter bandov sa zistilo, že u stutter bandov chýba jedna repetitívna jednotka (Walsh *et al.*, 1996).

Počet a lokalizácia repetitívnych jednotiek o veľkosti 4 bp sa rôzni medzi vzorkami, obsahujúcimi typické úseky s nízkym podielom stutter bandov. Podiel stutter bandov vzhľadom k produktu hlavnej alely narastá, pretože množstvo repetitívnych jednotiek narastá. Sekvenčné analýzy a výsledky získané použitím rôznych DNA-polymeráz vychádzajú z modelu posunu sklíznutého reťazca, kedy dochádza najčastejšie k vzniku stutter bandov (Walsh *et al.*, 1996).

## 4 Materiál a metódy

### 4.1 Biologický materiál

Použitá genomická DNA bola získaná izoláciou z krvi zo šiestich jedincov takatry tmavej (*Scopus umbretta*), z ktorých dvaja sú rodičia, dvaja ich potomkovia a ďalšie dva nepříbuzné jedince, ktoré sú voči tejto rodine nepříbuzné. Vzorky krvi boli odobrané v ZOO Dvůr Králové z jedincov pôvodom z dvoch nepříbuzných chovov v ZOO Arnhem a ZOO Amsterdam z Holandska a boli uchované v 1 ml Queen's pufri (Seutin *et al.*, 1991).

### 4.2 Izolácia genomickej DNA pre PCR amplifikáciu

Do mikroskúmaviek s objemom 1,5 ml pomocou špičky s ustrihnutým koncom napipetujeme 500  $\mu$ l roztoku krvi s Queen's pufrom (Seutin *et al.*, 1991) od jednotlivých jedincov. Pipetou pridáme 100  $\mu$ l roztoku proteínázy K (10 mg/ml), pretáčaním premiešame a pridáme 100  $\mu$ l 10% roztoku laurylsíranu sodného (SDS). Mikroskúmavky s roztokom inkubujeme počas noci až do nasledujúceho dňa za stáleho pretáčania v termostate pri teplote 37 °C. Ku zmesi pridáme 400  $\mu$ l fenolu a 400  $\mu$ l chloroformu, mikroskúmavky zvortexujeme a scentrifugujeme pri 2000 g počas piatich minút. Po centrifugácii vrchnú fázu opatrne odoberieme pipetou s ustrihnutou špičkou a prepipetujeme do ďalšej novej skúmavky tak, aby sme nenasali vlákna DNA spolu so zbytkami fenolu a chloroformu. Do tohto roztoku pridáme 700  $\mu$ l chloroformu, mikroskúmavky zase zvortexujeme a scentrifugujeme (2000 g/5 min). Po centrifugácii hornú fázu odoberieme pipetou s ustrihnutou špičkou a preniesieme do novej skúmavky, dávame pozor, aby sme nenasali vzniknutý biely zákal proteínov zo strednej fázy. Tento krok opakujeme ešte jedenkrát.

K tomuto roztoku pridáme 180  $\mu$ l vychladeného octanu sodného, s koncentráciou 3 mol/l a skúmavku doplníme vychladeným 96% etanolom. Následne obsah premiešame pretáčaním skúmavky a na dve hodiny vložíme do -20 °C. Všetky mikroskúmavky centrifugujeme 30 až 40 minút pri 13000 g. Etanol opatrne zlejeme,

aby sa nevyliat vzniknutý sediment DNA a pipetou pridáme 1 ml vychladeného 70% etanolu. Skúmavky centrifugujeme 10 minút pri 13000 g.

Etanol opätovne vylejeme a zabránime vyliatiu sedimentu DNA. Obsah v mikroskúmavkách preniesieme na termoblok a vysušíme. Do takto vysušenej DNA pripipetujeme 500 µl TE pufru. Uložíme do termostatu a za stáleho preklápania rozpustíme pri teplote 40 °C počas noci. Po rozpustení DNA stanovíme koncentráciu pomocou fluorometra vo všetkých mikroskúmavkách a uložíme pri teplote -20 °C, aby bolo možné DNA použiť aj po dlhšom čase avšak opätovným rozpustením v termostate pri teplote 40 °C cez noc.

#### **4.3 Testovanie konkrétnych mikrosatelitových markerov prostredníctvom *cross-species* PCR amplifikácie u takatry tmavej (*Scopus umbretta*)**

Pre hľadanie vhodných mikrosatelitových sekvencií som použila už známe a testované mikrosatelity, ktoré boli polymorfné u druhov z hlavných príbuzných radov vodných vtákov, konkrétne brodivce (Ciconiiformes), veslonožce (Pelecaniformes), plameniaky (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), potáplice (Gaviiformes) a niekoľkých nepríbuzných jedincov z radov bahniaky (Charadriiformes), tučniaky (Sphenisciformes) a zúbkozobce (Anseriformes).

Doteraz nie je presne stanovená fylogenetická príbuznosť takatry tmavej (*Scopus umbretta*) a je zaradzovaná ako medzi Ciconiiformes tak aj do radu Pelecaniiformes. Preto som zvolila testovanie väčšieho spektra mikrosatelitových sekvencií z vyššie uvedených radov, na základe čoho môže byť stanovená bližšia príbuznosť ku konkrétnemu radu alebo viacerým radom. Jednotlivé mikrosatelitové lokusy sú uvedené v Tabuľke 1.

**Tab.1:** Zoznam použitých primerov v *cross-species* PCR amplifikácii mikrosatelitov u takatry tmavej (*Scopus umbretta*).

Rad	Druh	Primery	Autor
Ciconiiformes	Lyžičiar ružový ( <i>Ajaia ajaja</i> )	Aaju1 Aaju2 Aaju3 Aaju4 Aaju5 Aaju6	Sawyer <i>et al.</i> , 2006
	Volavka statná ( <i>Ardea herodias</i> )	Ah205 Ah208 Ah209Ah210 Ah211 Ah212Ah217 Ah320 Ah341Ah343 Ah414 Ah421 Ah51 Ah522 Ah526 Ah536 Ah630	McGuire <i>et al.</i> , 2002
	Bocian biely ( <i>Ciconia ciconia</i> )	Cc01 Cc02 Cc03 Cc04 Cc05 Cc06 Cc07	Shephard <i>et al.</i> , 2009
		CC1 CC3 CC7 CC9 CC10 CC13	Gernot Segelbacher, ústne zdelenie
	Bocian čiernozobý ( <i>Ciconia boyciana</i> )	Cbo102 Cbo108 Cbo109 CBo121 Cbo133 Cbo151 Cbo168 Cbo235	Hui Wang <i>et al.</i> , 2011
	Myktéria holokrká ( <i>Mycteria americana</i> )	WSμ03 WSμ08 WSμ09 WSμ13 WSμ14 WSμ17 WSμ18 WSμ19 WSμ20 WSμ23 WSμ24	Tomasulo- Seccomandi <i>et al.</i> , 2003
		WS1 WS2 WS4 WS6	Van Den Bussche <i>et al.</i> , 1999
	Volavka čínska ( <i>Egretta eulophotes</i> )	Ae01 Ae04 Ae05 Ae09 Ae13 Ae24 Ae25 Ae26 Ae27 Ae28 Ae30 Ae35 Ae36 Ae37 Ae38 Ae42 Ae44 Ae47	Huang <i>et al.</i> , 2009
	Volavka strapatá ( <i>Egretta rufescens</i> )	Er21 Er22 Er23 Er41 Er42 Er43 Er44 Er51 Er31 Er45 Er24 Er46	Hill <i>et al.</i> , 2010
	Ibis červený ( <i>Eudocimus ruber</i> )	Eru02 Eru03 Eru04 Eru05 Eru06 Eru07 Eru08 Eru09 Eru10 Eru11	Santos <i>et al.</i> , 2006
	Chavkoš nočný ( <i>Nycticorax nycticorax</i> )	nycti22 nycti74 nycti14 nycti35 nycti26 nycti62 nycti68 nycti41 nycti43 nycti15 nycti36	Chang <i>et al.</i> , 2009
	Ibis chochlatý ( <i>Nipponia nippon</i> )	NnAF4 NnBF7 NnCE11 NnCG3 NnDD9 NnEB12 NnHB12 NnNF5 NnEA9 NnAD10 NnEH10 NnGF4 NnLF11	Ji <i>et al.</i> , 2004
Nn01 Nn03 Nn04 Nn12 Nn16 Nn17 Nn18 Nn21 Nn23 Nn25 Nn26		He <i>et al.</i> , 2006	
Lyžičiar čieročelý ( <i>Platalea minor</i> )	PM1-4 PM1-13 PM1-17 PM2-14 PM2-16 PM2-20 PM2-21 PM2-28 PM2-29 PM2-37 PM2-62 PM2-68 PM2-80 PM3-13 PM3-15 PM3-16 PM3-17 PM3-20 PM3-22 PM3-25 PM3-28 PM3-29 PM3-31	Yeung <i>et al.</i> , 2009	

**Tab. 1:** Pokračovanie 1.

Rad	Druh	Primery	Autor
Gaviiformes	Potáplica ľadová ( <i>Gavia immer</i> )	GimA12 GimC5 GimD12 GimE11 GimD9 GimC11 GimA9	McMillan <i>et al.</i> , 2004
Pelecaniformes	Fregata ebenová ( <i>Fregata minor</i> )	Fmin01 Fmin02 Fmin03 Fmin04 Fmin05 Fmin06 Fmin07 Fmin08 Fmin09 Fmin10 Fmin11 Fmin12 Fmin13 Fmin14 Fmin15 Fmin16 Fmin17 Fmin18	Deaborn <i>et al.</i> , 2008
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	COR01 COR03 COR05 COR06 COR07 COR12 COR15 COR17 COR19 COR20 COR21 COR22 COR23 COR26 COR28 COR30 COR31 COR35 COR38 COR39 COR40 COR41 COR43 COR45 COR47	Fike <i>et al.</i> , 2009
		Dcco-01 Dcco-02 Dcco-03 Dcco-04 Dcco-05 Dcco-06 Dcco-07 Dcco-08	Mercer <i>et al.</i> , 2010
	Pelikán biely ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	PeEr01 PeEr02 PeEr03 PeEr04 PeEr05 PeEr06 PeEr07 PeEr08 PeEr09	Hickman <i>et al.</i> , 2008
	Pelikán ružový ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	PEL086 PEL149 PEL175 PEL185 PEL188 PEL190 PEL207 PEL221 PEL265 PEL304	De Ponte Machado <i>et al.</i> , 2008
	Kormorán čierny ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )	PcD2 PcD4 PcD5 PcD6 PcT1 PcT3 PcT4	Piertney <i>et al.</i> , 1998
	Kormorán nelietavý ( <i>Phalacrocorax harrisi</i> )	PhC11 PhG12 PhB4 PhB2 PhB11 PhD11 PhF12 PhG8	Duffie <i>et al.</i> , 2008
	Sula červenonohá ( <i>Sula sula</i> )	Ss1B-16 Ss1B-51 Ss1B-57 Ss1B-98 Ss1B-106 Ss1B- 142 Ss2B-2 Ss2B-35 Ss2B- 48 Ss2B-71 Ss2B- 88 Ss2B- 92 Ss2B-110 Ss2B-138 Ss2B-153	Morris-Pocock <i>et al.</i> , 2010
	Sula guánová ( <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
	Sula modronohá ( <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	

**Tab. 1:** Pokračovanie 2.

Rad	Druh	Primery	Autor
Pelecaniformes	Faeton bioelochvostý ( <i>Phaethon lepturus</i> )	P3A3 P3A4 P3C1 P3D7 P3F3 P3F5 P3F7 P3G12 P3H10 P4F2 P4G1	Humeau <i>et al.</i> , 2010
	Kormorán chocholatý ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> )	Phaari01 Phaari02 Phaari03 Phaari04 Phaari05 Phaari06 Phaari07 Phaari08 Phaari09 Phaari11 Phaari12 Phaari13 Phaari14 Phaari15 Phaari16 Phaari17	Barlow <i>et al.</i> , 2010
Phoenicopteriformes	Plameniák červený ( <i>Phoenicopterus ruber</i> )	Pruμ1 Pruμ2 Pruμ3 Pruμ4 Pruμ5 Pruμ6 Pruμ7 Pruμ8 Pruμ9	Kapil <i>et al.</i> , 2010
		Pruμ13	Preston, 2005
	Plameniák ružový ( <i>Phoenicopterus roseus</i> )	PrA2 PrA3 PrA9 PrA102 PrA103 PrA104 PrA105 PrA110 PrA111 PrA113 PrB1 PrB2 PrB3 PrB102 PrB105 PrB110 PrC1 PrC6 PrC12 PrC101 PrC109 PrC117 PrC122 PrD3 PrD4 PrD5 PrD7 PrD9 PrD10 PrD12 PrD102 PrD105 PrD108 PrD117 PrD121PrD126 PrD139	Geraci <i>et al.</i> , 2010
Podicipediformes	Potápka červenokrká ( <i>Podiceps grisegena</i> )	PgAAT1 PgAAT3 PgAAT6 PgAAT8 PgAAT25 PgAAT34 PgAAT41	Sachs <i>et Hughes</i> , 1999
Charadriiformes	Kosierkár malý ( <i>Aethia pygmaea</i> )	Apy06 Apy07	Dawson <i>et al.</i> , 2005
Anseriformes	Kačica divá ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	APH07 APH 09	Maak <i>et al.</i> , 2000
		APH08 APH12 APH13 APH16	Maak <i>et al.</i> , 2003
	Pižmovka lesklá ( <i>Cairina moschata</i> )	CmAAT16 CmAAT35 CmAAT38	Stai <i>et Hughes</i> , 2003
	Laločnica potápavá ( <i>Biziura lobata</i> )	Blm1 Blm10 Blm12	Guay <i>et Mulder</i> , 2005
	Kajka morská ( <i>Somateria mollissima</i> )	Smo10	Paulus <i>et</i> Tiedmann, 2003
Sphenisciformes	Tučniak okatý ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	AM13	Roeder <i>et al.</i> , 2001

#### 4.3.1 PCR amplifikácia mikrosatelitov

Konkrétne reagenty boli napipetované do mikroskúmaviiek v takom poradí ako je uvedené v Tabuľke 2. Po rozpipetovaní jednotlivých zložiek bola výsledná zmes krátko zvortexovaná a sцентрифugovaná. Jednotlivé reakcie pozostávali z 9  $\mu\text{l}$  PCR mixu a 1  $\mu\text{l}$  roztoku DNA s koncentráciou od 5 po 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**Tab. 2:** Zloženie PCR mixu pre 6 vzoriek.

Zložky PCR zmesi	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
Deionizovaná voda	44,5
Storage Buffer 10x	6,7
Roztok $\text{MgCl}_2$ (25 mmol/l)	4,1
Roztok dNTPs (20 $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	0,8
Primer F (10 $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	3,5
Primer R (10 $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	3,5
<i>aTaq</i> -DNA polymeráza	1,5

Pripravené vzorky umiestnime do termocykléra so základným časovým profilom PCR reakcie.

- 94 °C: 5 min
  - 94 °C: 30 s
  - 50 °C: 30 s (viac vid' výsledky)
  - 72 °C: 30 s
- } 35 cyklov
- 72 °C: 7 min

### 4.3.2 Spracovanie PCR produktov

Pre samotné spracovanie PCR produktov bola použitá vyhrievaná sekvenačná elektroforetická komôrka S2 Whatman Biometra s rozmermi pre sklá 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a hrúbku gélu 0,4 mm.

#### Príprava 6% polyakrylamidového gélu

Väčšie sklo očistíme deionizovanou vodou a plochu, na ktorú bude priliehať gél ošetríme prípravkom pre odpudzovanie vody. Aplikujeme a papierovým obrúskom rozotrieme. Po 5 minútach opláchneme sklo deionizovanou vodou a utrieme do sucha.

Kratšie sklo očistíme deionizovanou vodou a saponátom a plochu, ktorá bude priliehať ku gélu ošetríme molekulárnym lepidlom. Rozotrieme papierovým obrúskom a necháme zaschnúť 5 až 10 minút. Po zaschnutí opláchneme štyrikrát 96% etanolom a vysušíme.

V digestore na väčšie sklo položíme spacersy o hrúbke 0,4 mm po oboch stranách a naň opatrne položíme menšie sklo ošetrenou plochou nadol. Obe sklá takto zafixujeme svorkami.

V kadičke si pripravíme polyakrylamidový gél. Roztok premiešame a opatrne lejeme medzi vopred pripravené sklá po celej dĺžke kratšieho skla na tom čele, kde toto sklo nedosahuje čelo dlhšieho skla. Ako lejeme gél tak mierne poklepávame na sklo, aby sa zabránilo vzniku bublín.

Ak je už priestor medzi sklami vyplnený géлом, do medzery vsunieme hrebienok jeho rovnou stranou asi 0,7 až 1 cm hlboko. Obe sklá pripneme štyrmi svorkami v mieste, kde je vložený hrebienok a necháme približne hodinu polymerizovať. Ak gél použijeme až na druhý deň tak čelá zabalíme do potravinárskej fólie, aby sme tým zabránili vysychaniu gélu.

#### Príprava na elektroforetickú separáciu

Po stuhnutí gélu odstránime všetky svorky a sklá dôkladne umyjeme od všetkých zvyškov polyakrylamidu, veľmi opatrne umyjeme priestor, kde sa nachádza hrebienok. Sklo osušíme papierovými obrúskami a pevne upevníme pomocou skrutkovacích úchytoch do elektroforetickej komôrky, hranou s hrebienkom nahor



a kratším sklom k hliníkovej doske elektroforetickej komôrky.

Katódový aj anódový priestor zalejeme 0,5 x TBE pufrom, opatrne vyberieme hrebienok a vzniknutú medzeru, ktorá vznikla medzi sklami dôkladne vyčistíme prúdom pufru z injekčnej striekačky od zvyškov gélu, aby sa dali naniest' vzorky. Katódový aj anódový priestor uzavrieme, nasadíme elektródy a na zdroji jednosmerného elektrického prúdu ako limitujúci faktor nastavíme hodnotu výkonu 90 W (hodnoty elektrického napätia a prúdu sú nastavené na maximum: 3000 V/150 mA). Za takýchto podmienok si gél predhrejeme asi 30 minút.

Pred samotným nanosením vzoriek tieto vzorky zmiešame z nanášacím pufrom v pomere dva objemové diely PCR produktu a jeden diel nanášacieho pufru a vložíme takto pripravené vzorky na 3 minúty do denaturačných podmienok (napr. termocyklér alebo termoblok vytemperovaný na 96 °C). Po vytiahnutí tieto vzorky okamžite vložíme do ľadovej drte, aby sme tak zabránili renaturácii už denaturovaných vlákien DNA produktov.

Počas denaturácie vypneme zdroj jednosmerného elektrického prúdu, odpojíme katódu, otvoríme katódový priestor a zase dôkladne vyčistíme medzeru pre hrebienok prúdom pufru z injekčnej striekačky od rozpustenej močoviny, zvyškov gélu a bublín, čo by nám bránilo v nanosení vzoriek do gélu. Do tejto medzery medzi sklami opatrne vsunieme hrebienok zúbkami asi 1 mm do gélu tak, aby nedošlo k zlomeniu alebo vykriveniu niektorého zúbku. Ideálny je hrebienok s tvarom zúbkov označovaný ako „sharktooth – žraločí zub“ a s označením MP, čo znamená, že hrebienok je vhodný pre nanášanie vzoriek 8 kanálovou pipetou a proces pipetovania sa tak výrazne urýchli.

Do takto pripraveného gélu môžeme naniest' po 2 µl jednotlivých vzoriek 8 kanálovou pipetou do medzier medzi zúbkami hrebienka. Na nanosenie všetkých vzoriek použijeme tie isté špičky, ktoré medzi nanášaním rôznych vzoriek prečistíme niekoľkonásobným nasatím a vypustením pufru z katódového priestoru pipetou. Po napipetovaní všetkých vzoriek katódový priestor uzavrieme, nasadíme elektródu a na zdroji jednosmerného elektrického prúdu nastavíme ako limitujúci faktor hodnotu výkonu 70 W (hodnoty elektrického napätia aj prúdu sú nastavené na maximum: 3000V/150mA).

### Elektroforetická separácia

Čas separácie vzoriek závisí od molekulárnych hmotností (dĺžky) rozdeľovaných PCR produktov. Orientačne je možné sa riadiť pomocou farby v nanášacom pufre – bromfenolovou modrou a xylénovou modrou, ktoré ukazujú priebeh elektroforézy. Platí, že v 6% polyakrylamidovom géli sa bromfenolová modrá pohybuje rovnako rýchlo ako reťazce DNA dlhé približne 60 párov báz a xylénová modrá ako reťazce DNA dlhé približne 220 párov báz. Doba separácie vzoriek je 1 až 3 hodiny.

Počas elektroforetickej separácie si pripravíme tieto roztoky - 800 ml roztoku 10% kyseliny octovej (fix/stop roztok), 800 ml roztoku 1% HNO<sub>3</sub>, 800 ml roztoku 0,1% roztoku AgNO<sub>3</sub> a 800 ml 3% roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (vývojka) – tento roztok sa umiestni do chladničky, aby sa vychladil na teplotu nižšiu ako 10 °C.

### Vyhodnocovanie

Po uplynutí elektroforetickej separácie, vypneme zdroj jednosmerného elektrického prúdu a odpojíme obe elektródy a kolieskom na pravej strane elektroforetickej komôrky otvoríme priechod, ktorým pufor z katódovej časti vytečie do zberného priestoru, povolíme skrutky úchytovej skiel a gél so sklom vyberieme a položíme do vodorovnej polohy menším sklom nahor. Z priestoru medzi sklami opatrne vyberieme oba spacery a sklá od seba odpáčime čepeľou noža.

Oddelené menšie sklo s prilepeným géлом vložíme do fotomisky – gélom nahor. Umiestnime na trepačku a zalejeme fix/stop roztokom. Fix/stop roztok necháme pôsobiť na gél približne 20 minút alebo pokiaľ sa nevymyje modrý pruh xylénovej modrej z gélu do roztoku.

Fix/stop roztok prelejeme do banky a sklo s gélom premyjeme trikrát po jednej minúte približne 1 až 1,5 l deionizovanej vody. Potom sklo premyjeme v roztoku HNO<sub>3</sub> 3 minúty a potom premyjeme gél štyrikrát po minúte približne v 1 až 1,5 l deionizovanej vody.

Sklo s gélom umiestnime na trepačku do 0,1% roztoku AgNO<sub>3</sub>, do ktorého tesne pred použitím pridáme 1,2 ml formaldehydu a tento roztok necháme na gél pôsobiť asi 30 minút.

Po uplynutí tejto doby si pripravíme jednu fotomisku s 1 – 2 l deionizovanej vody a druhú fotomisku s 800 ml vychladeného roztoku vývojky, do ktorého pridáme formaldehyd a  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

Roztok  $\text{AgNO}_3$  prelejeme do zásobnej fľaše. Sklo s gélom na 5 sekúnd ponoríme do misky s deionizovanou vodou a dáme do fotomisky na trepačke a zalejeme vývojkou, kde sledujeme vyvíjanie hnedočiernych striebrom ofarbených prúžkov PCR produktov.

Keď už sú prúžky dostatočne viditeľné zalejeme fix/stop roztokom ešte skôr ako začne gél tmavnúť. Gél necháme v roztoku asi 2 minúty alebo odhadom pokiaľ ešte z roztoku unikajú bublinky  $\text{CO}_2$ .

Potom sklo s gélom vložíme asi na 2 minúty do deionizovanej vody a dáme na 30 minút do sušičky, kde sa gél pri  $90^\circ\text{C}$  vysuší. Po vysušení sklo podpíšeme fixkou v mieste spaceru, kde nie je gél. Takto upravené sklo s gélom vyhodnotíme na negatoskope.

Z elektroforetogramu odčítame konkrétne alely všetkých mikrosatelitových lokusov u študovaných jedincov. Po vyhodnotení sklo s gélom ponoríme na niekoľko desiatok minút až niekoľko hodín do roztoku  $\text{NaOH}$  o koncentrácií 1 mol/l. Gél by sa mal úplne odlepiť. Sklo umyjeme a môžeme znovu použiť.

#### **4.4 Zoznam použitých chemikálií**

Akrylamid (Applichem)

a *Taq*-DNA polymeráza (5 U/ $\mu\text{l}$ ), M1241 (Promega)

Bromfenolová modrá (Serva)

Deionizovaná voda

Deoxyribonukleozid trifosfáty (100 mmol/l, 400  $\mu\text{l}$  z každého), U1240 (Promega)

Dusičnan strieborný (Lachema)

Etanol – 96% roztok (Lihovar Vrbátky)

Etyléndiaminotetraoctan sodný ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) (Lachema)

Etyléndiaminotetraoctová kyselina (Lachema)

Fenol (Sigma)

Formaldehyd (Lachema)

Formamid (Lachema)  
Hydroxid sodný (Lachema)  
Chlorid sodný (Lachema)  
Chloroform (Lachema)  
Kyselina boritá (Lachema)  
Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)  
Kyselina octová – ľadová (Lachema)  
Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)  
3-metakryloxypropyltrimetoxysilán (Serva)  
Močovina (Lachema)  
N, N'- metylénbisakrylamid (Applichem)  
N, N, N', N'- tetrametyletyléndiamín (TEMED) (Serva)  
Octan sodný (Lachema)  
Peroxodisíran amónny (Serva)  
Proteináza K (Sigma)  
Clear Vue, Rain Repellent (Turtle WAX)  
Tiosíran sodný (Lachema)  
Trishydroxymetylaminometán (Tris) (Applichem)  
Uhličitan sodný (Lachema)  
Xylenová modrá (Xylencyanol FF) (Applichem)

#### **4.5 Použité roztoky**

##### Zásobný roztok 6% akrylamidu:

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizovanej vody
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml zásobného 40% roztoku akrylamidu : N', N'- metylénbisakrylamid 19:1
- pre rozpustenie všetkých zložiek prefiltrovať a uložiť do tmavej fľaše pri 4 °C

Zásobný roztok 10x TBE pufry:

- 108 g trishydroxymetylaminometánu (Tris)
- 55 g kyseliny boritej  $H_3BO_3$
- 40 ml roztoku  $Na_2EDTA$  0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustiť v 800 ml deionizovanej vody a doplniť deionizovanou vodou na 1 l

Roztok 10% peroxidisíranu amónneho  $(NH_4)_2S_2O_8$ :

- 1 g  $(NH_4)_2S_2O_8$
- rozpustiť v 10 ml deionizovanej vody a uchovávať v chladničke

Roztok 3-metakryloxypropyltrimetoxysilánu:

- 1 ml 0,5% kyseliny octovej v 96% etanole
- 3  $\mu$ l 3-metakryloxypropyltrimetoxysilánu

6% Polyakrylamidový gél:

- 60 ml 6% zásobného roztoku akrylamidu
- 40  $\mu$ l N', N', N', N'- tetrametyletyléndiamínu
- 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxidisíranu amónneho  $(NH_4)_2S_2O_8$

Nanášací pufor pre elektroforézu v polyakrylamidovom géli:

- 0,125 g bromfenolovej modrej
- 0,125 g xylenovej modrej
- 25 ml deionizovanej vody
- 100 ml formamidu

Fix/stop roztok:

- 800 ml deionizovanej vody
- 88 ml ľadovej kyseliny octovej

Roztok 1% kyseliny dusičnej  $HNO_3$ :

- 800 ml deionizovanej vody
- 12 ml 65%  $HNO_3$

Roztok 0,1% dusičnanu strieborného  $\text{AgNO}_3$ :

- 0,8 g  $\text{AgNO}_3$
- objem doplniť deionizovanou vodou na 800 ml
- pred použitím pridať 1,2 ml formaldehydu

Vývojka:

- 800 ml deionizovanej vody
- 24 g uhličitanu sodného  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- dôkladne premiešať a dať do chladničky, aby sa roztok vychladil na teplotu nižšiu ako 10 °C
- pred použitím pridať 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu\text{l}$  1% roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Roztok hydroxidu sodného  $\text{NaOH}$  1 mol/l:

- 40 g hydroxidu sodného rozpustiť v 800 ml deionizovanej vody a doplniť deionizovanou vodou na 1 l

Queen's pufor:

- 10 ml zásobného roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,8
- 2 ml zásobného roztoku  $\text{NaCl}$  (5 mol/l)
- 2,92 g etyléndiaminotetraoctovej kyseliny (EDTA)
- 10 g N-lauroylsarkosínu rozpustiť v 900 ml deionizovanej vody
- pH upraviť na 7,5
- doplniť deionizovanou vodou na 1 l

TE pufor:

- 10 ml zásobného roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 200  $\mu\text{l}$  zásobného roztoku  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustiť v 900 ml deionizovanej vody
- doplniť deionizovanou vodou na 1 l a prefiltrovať

### Roztoky použité v izolácii DNA

- Fenol pH  $7,9 \pm 0,2$
- 100 ml fenol (Sigma P-4557) pH  $6,7 \pm 0,2$
- premiešať a nechať 2 – 4 hodiny odležať
- uchovávať max. 6 mesiacov pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

### **4.6 Vybavenie laboratória**

Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)

Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)

Chladnička kombinovaná (Whirlpool)

Laboratórne váhy MARK S 622 (BEL Engineering)

Magnetická miešačka MR Hei-Standard (Heidolph)

Mikropipety Finnpiette 0,5 až 10  $\mu\text{l}$  (osemkanálová) a 0,3  $\mu\text{l}$  až 1 ml (Labsystems)

Mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu\text{l}$  až 1 ml (Nichiryo)

Minicentrifúga Spectrafuge Mini (Cleaver)

Negatoskop NEGA1 (Maneko)

Sekvenačná elektroforetická komôrka S2 (Whatman Biometra)

Sušička CAT 8050 (Contherm)

Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Techne)

Termocyklér PTC 100-96 VHB (Bioteca)

Termocyklér XP Thermal Cyclers (BIOER technology)

Termocyklér GenePro (BIOER technology)

Trepačka Orbit 1 900 (Labnet International)

Vortex MS2 (Ika)

Výrobník deionizovanej a ultračistej vody typ 02 (AquaOsmotic)

Výrobník ľadu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

## 5 Výsledky

Vo svojej bakalárskej práci som otestovala dohromady 386 mikrosatelitov (viď Tab. 2) z hlavných príbuzných radov vodných vtákov, konkrétne brodivce (Ciconiiformes) 157 mikrosatelitov, 152 mikrosatelitov z radu veslonožce (Pelecaniformes) a z radu plameniaky (Phoenicopteriformes) 47 mikrosatelitov, ďalej po 7 mikrosatelitov od radov potápky (Podicipediformes) a potáplice (Gaviiformes) a niekoľko mikrosatelitov od nepríbuzných jedincov z radov bahniaky (Charadriiformes), tučniaky (Sphenisciformes) a zúbkozobce (Anseriformes).

Všetky mikrosatelity som testovala na šiestich jedincoch takatry tmavej (*Scopus umbretta*). Využila som techniku *cross-species* PCR amplifikácie, prvýkrát pri teplote annealingu 50 °C. Niektoré primery neposkytli produkty pri tejto teplote, tak som zvolila teplotu 48 °C a pokiaľ neposkytli produkt ani pri tejto teplote, použila som teplotu 46 °C. Vylúčila som všetky monomorfné mikrosatelity a polymorfné som v ďalších testoch optimalizovala upravením teploty annealingu a času elektroforetickej separácie. Čas separácie sa pohyboval v rozmedzí od 90 až po 180 minút a  $T_a$  od 46 po 66 °C.

Z 386 amplifikujúcich párov primerov bolo monomorfných celkovo 363 a polymorfných bolo 23. Všetky polymorfné lokusy sú podrobne vyznačené v tabuľke číslo 3. Žiadny z mikrosatelitov nebol bez produktu. Mikrosatelity z radov potápky, potáplice, bahniaky a tučniaky neposkytli žiadny polymorfný produkt.



**Tab. 3:** Jednotlivé polymorfne mikrosatelity takatry tmavej (*Scopus umbretta*) a ich charakteristika. Tabuľka obsahuje názov lokusu spolu z číslom z databázy GeneBank, sekvenciu oboch primerov, teplotu annealingu, čas elektroforetickej separácie, počet aliel a zdrojový druh, pre ktorý bol mikrosatelit navrhnutý.

Názov lokusu (GeneBank)	Sekvencia primerov	T <sub>a</sub> (°C)	Čas separácie (h)	Počet aliel	Zdrojový druh
Cc02 (FJ440853)	F:CGCTCGCTGTCTTTATCTCC R:CTGCTGCATGCCAGTTGAT	65	3	3	Bocian biely ( <i>Ciconia ciconia</i> )
Ah343 (AF447956)	F: CATTGCTTAACTTCTGAAGAAAC R:CTTGACCCAGCATTTGTGAATAAACTG	55	2,5	2	Volavka statná ( <i>Ardea herodias</i> )
Er21 (HM368080)	F: AGGAAGAGGAGAGGTTGAGGT R: CCAAGAGCACTTTTCTATCAAG	64	2,5	3	Volavka strapatá ( <i>Egretta rufescens</i> )
NnGF4 (AJ699413)	F: GATACTTCATATATCAATAGCTC B: TTTCCTCGCTCTTTCCTGAC	62	2,5	3	Ibis chochlatý ( <i>Nipponia nippon</i> )
NnLF11 (AJ699415)	F: TTTCTTCTGGACTTCTTTAGG B: AAAACATTGGAAGTGGTTATAG	60	2,5	2	
nycti41 (EU582035)	F:AACTGATTTCTCACACTTACTAGGC R:GCTTGAATTCGTATTGCTCTGT	66	2,5	2	Chavkoš nočný ( <i>Nycticorax nycticorax</i> )
Cbo121 (HM120204)	F:CCACAATGGCAATTTTTCAC R:GTTCTCCCAGAGGCTTGCTC	66	2	3	Bocian čiernozobý ( <i>Ciconia boyciana</i> )

**Tab. 3** Pokračovanie 1.

Názov lokusu (GeneBank)	Sekvencia primerov	T <sub>a</sub> (°C)	Čas separácie (h)	Počet aliel	Zdrojový druh
PeEr 01 (EU391161)	F: GCATTGCTGCCCTTCTATCC R: ATCTGGCTCCTCATAGCCC	65	2,5	2	Pelikán biely ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )
PeEr 02 (EU391162)	F: AGATCCATGGCATTGTGCTG R: AGTCCCTCCTGGAATGTGG	52	3	2	
PeEr 03 (EU391163)	F: GCACAGCTGGTTTGTAACTTTTC R: GTGCCCTTCAATTAGGAGTCAG	66	3	3	
P3F7 (HM638071)	F: TCTCGTGAGTAGAGTTTGCCAG R: GCCAGCATCAATAACAGAAGTG	66	2,5	2	Faetón bieločvostý ( <i>Phaethon lepturus</i> )
Phaari06 (GU296118)	F: GATCAGAATTTGGCGCTCTG R: AAGCTTTCCAAACCAGATTCAG	49	1,5	2	Kormorán chochlatý ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> )
Phaari08 (GU296120)	F: GATAGCTGGGGACTGGAC R: CAAGTCCCTCTTGCTTTT	60	2	2	
Phaari 13 (GU296124)	L: CCACATACTGCATACTCATTTGG R: ATGGCAGAAACGGTCACATT	46	2	2	
Fmin18 (EU700052)	F: AACAAAGTGGTCTCTCAAATCACC R: CAAACCCAAACACAAAACC	57	2,5	2	Fregata ebenová ( <i>Fregata minor</i> )

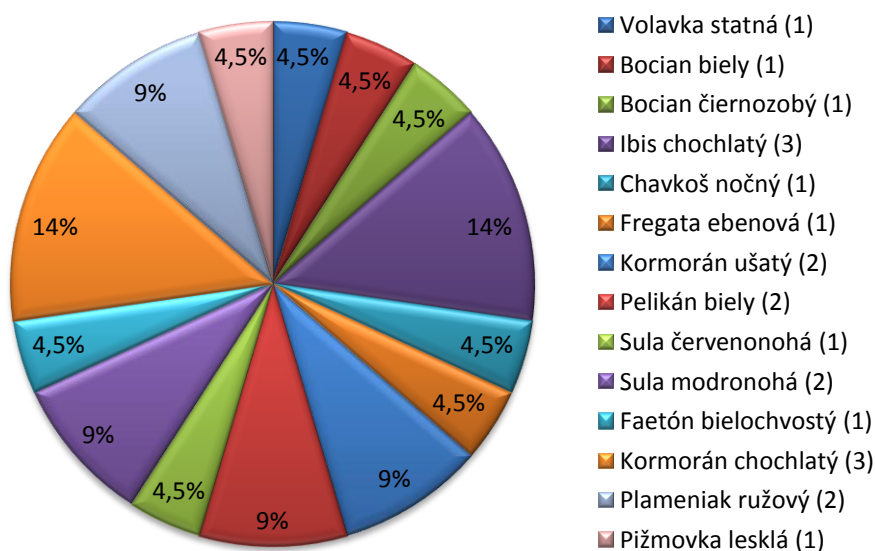
**Tab. 3:** Pokračovanie 2.

Názov lokusu (GeneBank)	Sekvencia primerov	Ta (°C)	Čas separácie (h)	Počet aliel	Zdrojový druh
Sn2A-36 (GU167935)	F: AATGTGTTCTTGACTTTGACA R: TTTTTCATCCACATCAAAGG	59	2,5	2	Sula modronohá ( <i>Sula nebouxii</i> )
BOOB-RM3-F11 (FJ587411)	U: GTTTAGAGGGTGTAGGCTGAAATC L: ATTCTCTAGGCAAGGATCAATACC	66	2,5	2	
COR 17 (FJ477905)	F: CTGCCTCACTGATGTAAATGC R: AACTCCAGTGACTGCCAAA	60	3	2	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )
Dcco-07 (nevedené)	F:TGCCTCACTGATGTAAATGC R:TACCAGATAAGAATGGTGCC	58	1,5	2	
Ss2b-110 (GU175418)	F: CCAGAGAGAATTTCCATTGC R: CCATCTGTGTTGAAGGGGTA	59	2	3	Sula červenonohá ( <i>Sula sula</i> )
PrD102 (GF101845)	F: TCTTCAACAAGCCAAGATCA R: TGGGTTACTGCTGCTATTCA	60	3	5	Plameniak ružový ( <i>Phoenicopterus roseus</i> )
PrC101 (GF101841)	F: CCGACTGTTCATCCACCT R: CCTAACTGGGGAGGACAAC	50	2	3	
CmAAT 38 (AF510866)	F: TCCCGAGCTACCACATTGAC R: AGCAACTGGAAGGCATTTATCT	53	1,5	2	Pižmovka lesklá ( <i>Cairina moschata</i> )

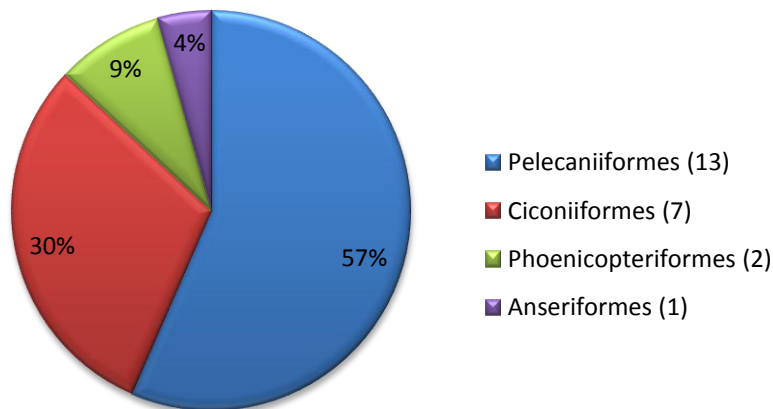
Najviac polymorfných mikrosatelitových lokusov u takatry tmavej sa amplifikovalo od radu veslonožce a to 13 (Graf 2). Konkrétne tri lokusy som amplifikovala pomocou primerov od kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*) a tri lokusy som objavila amplifikáciou primerov od kormorána chochlatého (*Phalacrocorax aristotelis*). Primery navrhnuté pre pelikána bieleho (*Pelecanus erythrorhynchos*) amplifikovali dva lokusy a tak isto dva lokusy som amplifikovala použitím primerov od suly modronohej (*Sula nebouxii*). Po jednom polymorfnom lokuse som amplifikovala prostredníctvom primerov navrhnutých pre fregatu ebenovú (*Fregata minor*), sulu červenonohú (*Sula sula*) a faetóna bielochvostého (*Phaethon lepturus*).

Z radu brodivce som amplifikovala celkovo 7 polymorfných mikrosatelitov (Graf 2). Primery od ibisa chochlatého (*Nipponia nippon*) poskytli tri polymorfné lokusy a primery odvodené od druhov volavka statná (*Ardea herodias*), chavkoš nočný (*Nycticorax nycticorax*), bocian biely (*Ciconia ciconia*) a bocian čiernozobý (*Ciconia boyciana*) amplifikovali po jednom polymorfnom lokuse. Druh plameniak ružový (*Phoenicopterus roseus*) z radu plameniaky amplifikoval dva polymorfné mikrosatelity pomocou primerov navrhnutých pre tento druh. A z radu zúbkozobce som amplifikovala jeden lokus pomocou primeru navrhnutého pre pižmovku lesklú (*Cairina moschata*). Konkrétny počet mikrosatelitov z príslušných druhov, ktoré som amplifikovala u takatry tmavej je zaznamenaný na Grafe 1.

**Graf 1:** Percentuálne zastúpenie polymorfných mikrosatelitov u takatry tmavej (*Scopus umbretta*), vzhľadom k ich druhovému pôvodu.

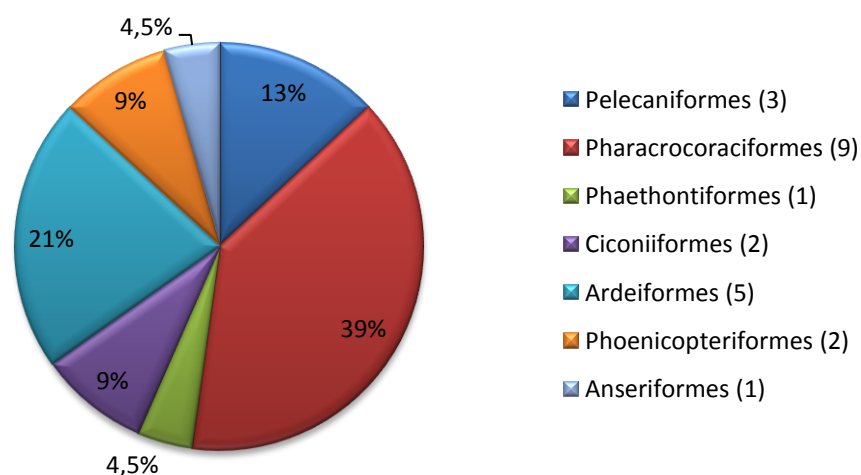


**Graf 2:** Percentuálne zastúpenie polymorfných mikrosatelitov u takatry tmavej vzhľadom k zdrojovým radom.



Graf číslo 3 obsahuje rady vtákov podľa nového taxonomického rozdelenia, od ktorých sa amplifikovali polymorfné mikrosatelitové lokusy u takatry. V tradičnom systéme sa nachádza iba rad Pelecaniformes (veslonožce), ktorý sa podľa nového systému rozštiepuje na dva samostatné rady Phalacrocoraciformes (veslonožce) a Pelecaniformes (pelikány). Rad Ciconiiformes (brodivce) sa v novom systéme rozštiepuje na samostatné rady Ciconiiformes (bociany) a Ardeiformes (brodivce). Rad Phaethontiformes, ktorý pôvodne patril ako čeľaď do radu veslonožce je v tomto prípade samostatným radom. Rady Anseriformes a Phoenicopteriformes svoje zaradenie nezmenili (Kovalik *et al.*, 2010). Tabuľka číslo 4 obsahuje konkrétne polymorfné mikrosatelity z príslušných zdrojových druhov tak ako sú zaradené podľa tradičného i nového systému.

**Graf 3:** Percentuálne zastúpenie polymorfných mikrosatelitov nájdených u takatry tmavej (*Scopus umbretta*) vzhľadom k novému taxonomickému zaradeniu druhov do príslušných radov podľa Kovalik *et al.* (2010).



**Tab 4:** Polymorfne mikrosatelity amplifikujúce sa u takatry tmavej (*Scopus umbretta*) od príslušných zdrojových druhov. Porovnanie ich taxonomického zaradenia v starom a novom systéme.

Rad		Druh	Polymorfne mikrosatelity
Starý systém	Nový systém		
Pelecaniformes	Pelecaniformes	Pelikán biely ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03
	Phalacrocoraciformes	Fregata ebenová ( <i>Fregata minor</i> )	Fmin 18
		Sula modronohá ( <i>Sula nebouxii</i> )	BOOB-RM3-F11, Sn2A-36
		Sula červenonohá ( <i>Sula sula</i> )	Ss2B-110
		Kormorán chocholaty ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> )	Phaari 06, Phaari 08, Phaari 13
		Kormorán ušaty ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	COR 17, Dcco 07
	Phaethontiformes	Faeton bioelochvostý ( <i>Phaethon lepturus</i> )	P3F7
Ciconiiformes	Ciconiiformes	Bocian biely ( <i>Ciconia ciconia</i> )	Cc 02
		Bocian čiernozobý ( <i>Ciconia boyciana</i> )	Cbo 121
	Ardeiformes	Ibis chochlatý ( <i>Nipponia nippon</i> )	NnGF4, NnLF11
		Chavkoš nočný ( <i>Nycticorax nycticorax</i> )	nycti 41
		Volavka statná ( <i>Ardea herodias</i> )	Ah 343
		Volavka strapatá ( <i>Egretta rufescens</i> )	Er 21
Phoenicopteriformes	Phoenicopteriformes	Plameniák ružový ( <i>Phoenicopiterus roseus</i> )	PrC 101, PrD 102
Anseriformes	Anseriformes	Pižmovka lesklá ( <i>Cairina moschata</i> )	CmAAT 38

Podľa tradične používaného systému sa zo 152 párov primerov z radu veslonožce amplifikovalo 13 polymorfnych mikrosatelitov, čo znamená 8,6% úspešnosť nájdenia nových polymorfnych mikrosatelitov. Jeden polymorfny mikrosatelit prislúcha na 11,63 testovaných mikrosatelitov. Z radu brodivce sa zo 157 párov primerov amplifikovalo 7 polymorfnych mikrosatelitov s úspešnosťou 4,45 % nájdenia nových

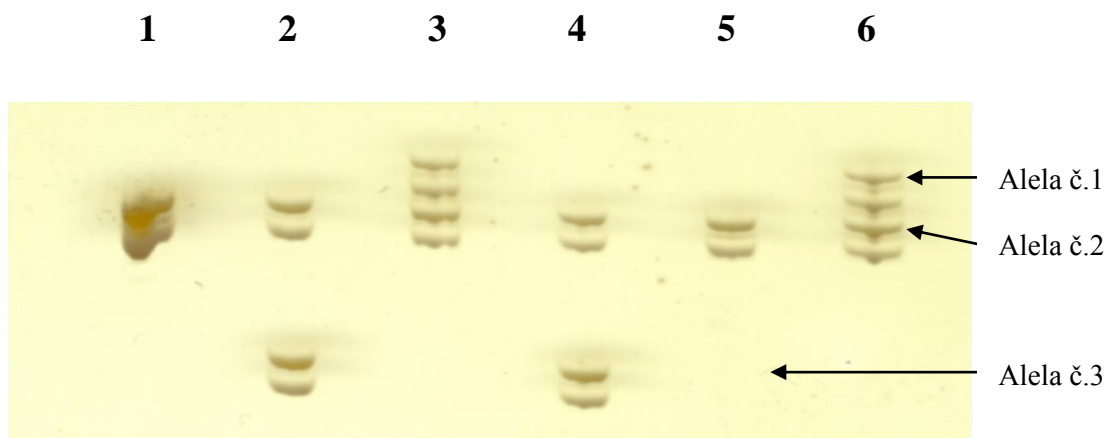
polymorfných mikrosatelitov, čo predstavuje jeden polymorfný mikrosatelit na 22,5 testovaných mikrosatelitov z tohto radu. Z radu Phoenicopteriformes sa zo 47 párov primerov úspešne amplifikovali dva mikrosatelity, čo predstavuje 4,25% úspešnosť nájdenia nových polymorfných mikrosatelitov a na každých 23,5 testovaných mikrosatelitov jeden polymorfný mikrosatelit. Najvyššie percento príbuznosti s takatrou je u veslonožcov. Brodivce a plameniaky vykazujú takmer rovnaké percento príbuznosti s takatrou, ale menšie ako veslonožci.

Úspešnosť získania nových polymorfných mikrosatelitov u takatry tmavej v prípade, že použijem polymorfne mikrosatelity od príslušných druhov tak ako sú zaradené v novom systéme podľa Kovalik *et al.* (2010) je nasledovné: z radu Pelecaniformes, ktorý má 19 mikrosatelitov, polymorfny produkt poskytli tri mikrosatelity, úspešnosť amplifikácie týchto mikrosatelitov je 15,79 %, čo predstavuje jeden polymorfny mikrosatelit na každých 6,33 testovaných mikrosatelitov. Rad Phalacrocoraciformes má 122 mikrosatelitov, z ktorých bolo 10 polymorfnych. Úspešnosť amplifikácie preto je 8,2 % a na každých 12,2 testovaných mikrosatelitov bude jeden mikrosatelit polymorfny. 21 mikrosatelitov sa nachádza v rade Ciconiiformes a zistila som dva polymorfne mikrosatelity z úspešnosťou nájdenia nových polymorfnych mikrosatelitov 9,52 %. Na každých 10,5 testovaných mikrosatelitov bude jeden polymorfny. Päť polymorfnych mikrosatelitov je z radu Ardeiformes, ktorý má celkovo 136 mikrosatelitov a na každých 27,2 testovaných mikrosatelitov bude jeden polymorfny z úspešnosťou nájdenia nových polymorfnych mikrosatelitov 3,68 %. Zo samostatného radu Phaethontiformes som našla iba jeden polymorfny mikrosatelit z 11 testovaných mikrosatelitov a úspešnosť amplifikujúcich sa nových polymorfnych mikrosatelitov môžem hodnotiť 9,1 %.

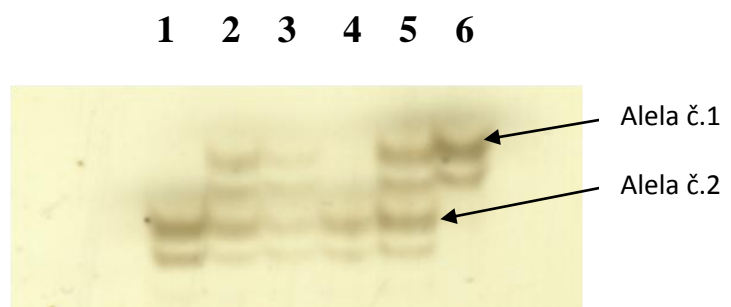
Čiže podľa údajov, ktoré som získala v praktickej časti, je takatra tmavá vzhľadom na tradičný systém, bližšia príbuzná z radom Pelecaniformes a vzdialenejšia príbuzná z radmi Phoenicopteriformes a Ciconiiformes. Ale podľa nového systému je takatra bližšia príbuzná z radom Pelecaniformes a vzdialená je príbuzná aj z radmi Phalacrocoraciformes, Ciconiiformes a Ardeiformes. Percentuálne zastúpenie polymorfnych mikrosatelitov u Phoenicopteriformes sa v novom systéme nemení. Avšak predpokladané príbuzenstvo z potápkami a potápicami som testovaním príslušných mikrosatelitov nedokázala.

Niektoré polymorfne mikrosatelity po elektroforetickej separácii poskytovali veľa stutter bandov, čím bolo sťažené ich správne vyhodnotenie, ako je možné vidieť na obrázku číslo 4. Preto som zvolila väčší čas elektroforetickej separácie. Na obrázku číslo 3 sú bandy dobre hodnotiteľné. Nulové alely som pri hodnotení PCR produktov nenašla.

**Obr. 3:** Elektroforetogram znázorňujúci mikrosatelitový lokus PeEr 03, ktorý amplifikoval tri alely u šiestich jedincov takatry tmavej.  $T_a$  bola upravená na 66 °C a elektroforetická separácia prebiehala tri hodiny.



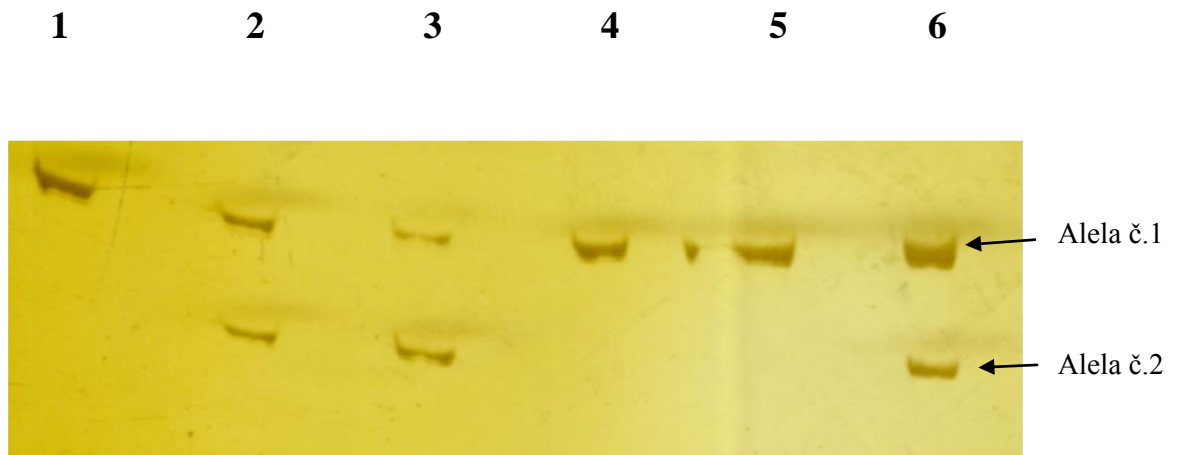
**Obr. 4:** Elektroforetogram, na ktorom sa nachádza produkt PCR amplifikácie mikrosatelitu Phaari 13, ktorý má dve alely,  $T_a$  bola upresnená na 46 °C pri polovičnej koncentrácii  $MgCl_2$  a čas elektroforetickej separácie dve hodiny.





Mikrosatelit Sn2A-36 od suly modronohej sa svojou amplifikáciou podobá na pohlavné markery, napríklad P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998) a na základe jeho genotypu je možné určiť pohlavie jedincov. Na obrázku číslo 5 u samíc číslo 2, 3 a 6 sa amplifikovali dve alely a u samcov číslo 1, 4 a 5 jedna alela.

**Obr. 5:** Elektroforetogram PCR produktu amplifikácie mikrosatelitu Sn2A-36, ktorý poskytol dve alely pri  $T_a$  59 °C a elektroforetická separácia trvala 2,5 hodiny.



## 6 Diskusia

Celkovo som otestovala 386 párov primerov z príbuzných aj nepríbuzných radov vodných vtákov pomocou techniky PCR *cross-species* amplifikácie. Z týchto párov primerov sa amplifikovalo u takatry tmavej 23 polymorfných lokusov.

Otestovala som všetkých 18 párov primerov navrhnutých pre fregatu ebenovú (*Fregata minor*), ale iba jeden mikrosatelit Fmin 18 amplifikoval dve alely u takatry, pri teplote annealingu 57 °C, ale podľa testovania Dearborn *et al.* (2008) na 23 jedincoch, získali amplifikáciou tohto mikrosatelitu 9 aliel pri teplote annealingu 55 °C.

Amplifikovala som mikrosatelit COR 17 z 25 mikrosatelitov od kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), ktorý poskytol dve alely pri  $T_a$  60 °C, ale v štúdií Fike *et al.* (2009) neuvádzajú teplotu pre tento mikrosatelit, od ktorého získali 3 alely. Testovali ho na 31 jedincoch.

U takatry som úspešne amplifikovala ešte jeden mikrosatelit z ôsmich od kormorána ušatého, Dcco 07, pri teplote annealingu 58 °C a získala som dve alely, ale v práci Mercer *et al.* (2010), kde ho testovali na 60 jedincoch z troch samostatných populácií, amplifikovali päť aliel pri teplote annealingu 54 °C.

Od pelikána bieleho (*Pelecanus erythrorhynchos*) som otestovala 9 párov primerov a PeEr 01, PeEr 02 a PeEr 03 poskytli polymorfný produkt. PeEr 01 u takatry amplifikoval dve alely pri  $T_a$  65 °C, PeEr 02 dve alely pri  $T_a$  52 °C a PeEr 03 úspešne amplifikoval tri alely pri  $T_a$  66 °C. Hickman *et al.* (2008) amplifikovali PeEr 01 tri alely, PeEr 02 šesť aliel a PeEr 03 tiež šesť aliel, všetky pri teplote annealingu 60 °C. Tieto mikrosatelity testovali na 23 jedincoch.

Z 15 mikrosatelitov navrhnutých pre sulu červenonohú (*Sula sula*) mi u takatry úspešne amplifikoval mikrosatelit Ss2B-110 tri alely pri teplote annealingu 59 °C, ale Morris-Pocock *et al.* (2010) ho amplifikovali pri  $T_a$  52 °C a získali štyri alely. Tento mikrosatelit testovali na 30 jedincoch.

Amplifikáciou 11 mikrosatelitov, navrhnutých pre sulu modronohú (*Sula neboxii*) som získala polymorfný produkt z mikrosatelitu BOOB-RM3-F11, pri teplote annealingu 66 °C a zistila som prítomnosť dvoch aliel, ale 22 aliel pri teplote 60 °C

amplifikovali podľa tohto mikrosatelitu Faircloth *et al.* (2009). Všetkých 11 mikrosatelitov autori testovali na 31 jedincoch a počet aliel sa pohyboval od 3 do 22.

Od suly modronohej som zo 6 mikrosatelitov úspešne amplifikovala ešte mikrosatelit Sn2A-36. Našla som dve alely pri teplote annealingu 59 °C. U Taylor *et al.* (2010) ho testovali na 24 jedincoch, na ktorých sa amplifikovala iba jedna alela pri bližšie nešpecifikovanej teplote a tento mikrosatelit určili ako monomorfny.

U takatry tmavej som od faetóna bielochvostého (*Phaethon lepturus*) amplifikovala 11 mikrosatelitov a z mikrosatelitu P3F7 som získala dve alely pri  $T_a$  66 °C a Humeau *et al.* (2010) amplifikovali tento mikrosatelit pri teplote 56 °C a objavili 10 aliel. Tento mikrosatelit spolu so zvyšnými testovali na 55 jedincoch tohto druhu.

Testovaním 16 mikrosatelitov od kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*) som amplifikáciou Phaari 06, Phaari 08 a Phaari 13 získala zhodne po dve alely pri teplotách annealingu 49 °C, 60 °C a 46 °C iba s polovičnou koncentráciou  $MgCl_2$ , ale podľa Barlow *et al.* (2010) mikrosatelit Phaari 06 amplifikoval 9 aliel, mikrosatelit Phaari 08 amplifikoval päť aliel. Autori teplotu annealingu neuvádzajú. Mikrosatelit Phaari 13 autori nezahrnuli do testov, preto nie je uvedený počet aliel ani teplota annealingu. Mikrosatelity Phaari 06 a Phaari 08 testovali na 40 jedincoch kormorána chochlatého.

Zo 17 mikrosatelitov odvodených od volavky statnej (*Ardea herodias*) som u takatry úspešne amplifikovala jeden mikrosatelit Ah 343, ktorý poskytol dve alely pri  $T_a$  55 °C. McGuire *et Noor* (2002) testovali tento mikrosatelit na 40 jedincoch pri  $T_a$  59 °C a amplifikáciou našli 9 aliel.

Od bociana bieleho (*Ciconia ciconia*) som amplifikovala 7 mikrosatelitov a od mikrosatelitu Cc 02 som získala tri alely pri  $T_a$  65 °C. V publikácii Shephard *et al.* (2009) amplifikáciou našli 2 alely pri  $T_a$  54 °C testovaním na 30 jedincoch. Od tohto druhu som ešte otestovala 6 mikrosatelitov, ktoré mi ústne poskytol profesor Segelbacher, ktoré však boli všetky monomorfne.

Amplifikáciou mikrosatelitu Cbo 121 od bociana čiernozobého (*Ciconia boyciana*) som objavila tri alely pri teplote annealingu 66 °C a v práci Wang *et al.* (2011) testovaním na 23 jedincoch získali 8 aliel pri teplote annealingu 55 °C. Otestovala som osem mikrosatelitov od tohto druhu.

Od chavkoša nočného (*Nycticorax nycticorax*) som analyzovala 11 mikrosatelitov a amplifikáciou mikrosatelitu nycti 41 som získala dve alely pri  $T_a$  66 °C, ale v práci Chang *et al.* (2009) autori testovali tento mikrosatelit na 32 jedincoch a našli 9 aliel pri  $T_a$  55 °C.

Amplifikáciou mikrosatelitov NnGF 4 a NnLF 11 navrhnutých pre ibisa chochlatého (*Nipponia nippon*) som našla u prvého tri alely a u druhého mikrosatelitu dve alely pri  $T_a$  62 a 60 °C. V publikácii Ji *et al.* (2004) testovali tieto mikrosatelity na 107 jedincoch pri  $T_a$  57 a 59 °C, u ktorých našli iba po jednom mikrosatelite a boli preto vyhlásené za monomorfné. Celkovo som od týchto autorov otestovala 13 mikrosatelitov a od He *et al.* (2006) som otestovala 11 mikrosatelitov navrhnutých pre ibisa chochlatého, z ktorých boli všetky monomorfné.

Od volavky strapatej (*Egretta rufescens*) som amplifikáciou mikrosatelitu Er 21 získala tri alely pri  $T_a$  64 °C, Hill *et Green* (2010) získali dve alely pri  $T_a$  56,8 °C a tento mikrosatelit bol testovaný na 31 jedincoch. Ja som otestovala 12 mikrosatelitov od tohto druhu.

Z radu plameniaky som amplifikovala dva mikrosatelity a oba od druhu plameniak ružový (*Phoenicopterus roseus*). Konkrétne mikrosatelit PrC 101 amplifikoval tri alely pri teplote annealingu 50 °C a mikrosatelit PrD 102 amplifikoval päť aliel pri teplote annealingu 60 °C, ale v práci Geraci *et al.* (2010) určili teplotu oboch mikrosatelitov na 53 °C a amplifikovali päť aliel použitím prvého mikrosatelitu a sedem aliel od druhého mikrosatelitu. Tieto dva mikrosatelity testovali na 26 jedincoch. Analyzovala som 37 mikrosatelitov od tohto druhu.

Z radu zúbkozobce som testovala 13 mikrosatelitov, ale iba jediný mikrosatelit CmAAT 38 od pižmovky lesklej (*Cairina moschata*) amplifikoval dve alely pri teplote annealingu 52 °C, v práci Stai *et Hughes* (2003) autori amplifikovali tento mikrosatelit a získali 16 aliel pri teplote annealingu 55 °C na 16 jedincoch. Dohromady otestovali 16 jedincov z čeľade Anatidae *cross-species* PCR amplifikáciou. Testovaním všetkých mikrosatelitov autori objavili 9-16 aliel.

Mikrosatelit SnA2-36 môžem označiť za pohlavný marker, lebo testovaním na 6 jedincoch, u samíc poskytol dve alely a u samcov jednu alelu.

Tento mikrosatelit bol testovaný na 14 samiciach a 10 samcoch druhu bocian čierny (*Ciconia nigra*), kde sa predpokladala väzba na chromozóm Z a W. V práci sa porovnaním produktov tohto mikrosatelitu a pohlavného markeru 2550F/2718R potvrdilo, že použitím tohto mikrosatelitu sa dá rozlíšiť samčie a samičie pohlavie (Cahlíková, 2011). V diplomovej práci Chmelářová (2012) bolo zistené, že u samcov má homozygotnú a u samíc heterozygotnú konštitúciu aliel. Je možné, že tento mikrosatelit leží práve na takej časti chromozómu Z, ktorá sa rekombinuje s chromozómom W. Tento mikrosatelit pripomína markery pre určenie pohlavia, napríklad (2550F/2718R) (Fridolfsson *et* Ellegren, 1999) a P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998).

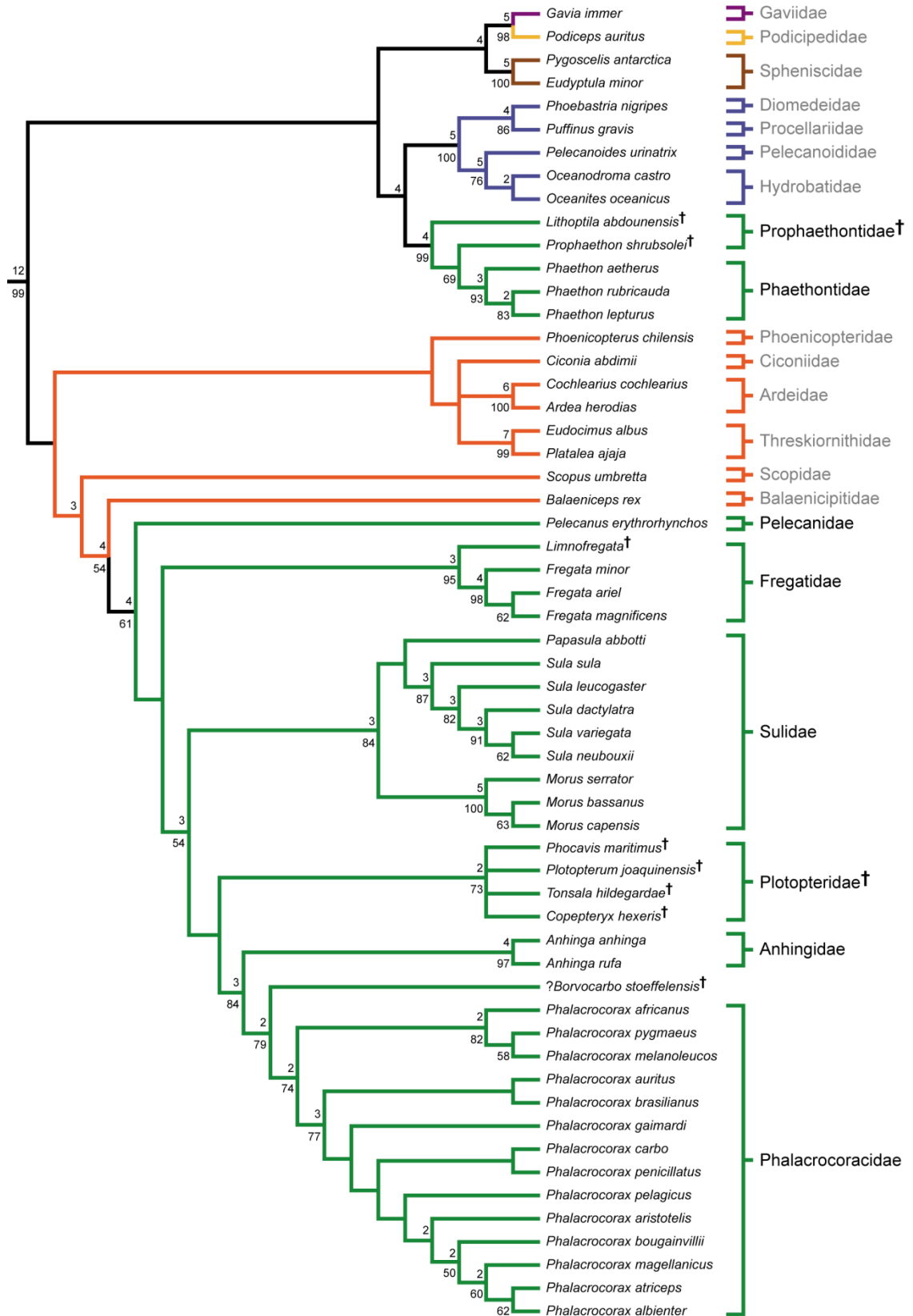
V práci Burianová (2011) bol tento mikrosatelit testovaný na 23 jedincoch druhu bocian biely (*Ciconia ciconia*), kde poskytol 4 alely. Samice sa vyznačovali tým, že sa u nich amplifikovala jedna rovnaká alela (alela štyri) a u samcov táto alela vždy chýbala, čo sa opäť dalo využiť k určeniu pohlavia.

Presnejším zaradením takatry do systému sa začalo zaoberať viacero vedcov. V kladogramoch na obrázku 6 a 7 je vidieť veľké rozdiely v zaradení takatry do systému. Z obrázku 6 vyplýva, že takatra bola vždy radená do Ciconiiformes, ale ako priama príbuzná s člnozobcom kráľovským a bližšia príbuzná s pelikánmi, volavkami a ibismi, vzdialenejšia príbuzná s anhingami, fregatami, kormoránmi a sulami a veľmi vzdialená príbuzná s bocianmi (Peters *et al.*, 1979, Sibley *et* Monroe, 1990, Livezey *et* Zusi, 2007).

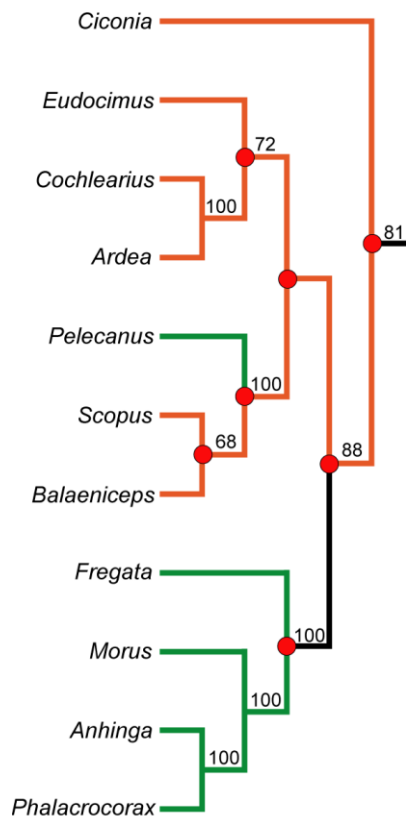
**Obr. 6:** Taxonomické zaradenie takatry tmavej podľa troch rôznych autorov (Peters *et al.*, 1979, Sibley *et* Monroe, 1990, Livezey *et* Zusi, 2007) kde vo farebných stĺpcoch je uvedený rad: ARD-Ardeiformes, BAL-Balaenicipitiformes, CIC-Ciconiiformes, GAV-Gaviiformes, PEL-Pelecaniformes, PRO-Procellariiformes, SPH-Sphenisciformes do ktorého ju konkrétny autor zaraďuje (Heacket *et al.* 2008).



**Obr. 7:** Taxonomické zaradenie takatry tmavej podľa Smith (2010), kde je v sesterskom vzťahu s Balaenicipitidae, príbuzná s Pelecaniformes a zaradená v blízkosti čeľade Pelecanidae a vzdialená príbuzná s Phaethontidae.



Zo zistených hodnôt vyplýva, že takatra tmavá (*Scopus umbretta*) je príbuzná s veslonožcami, brodivcami a plameniakmi. Ale podľa prítomného polymorfizmu, patrí viac do taxonomického radu veslonožce ako do ostatných dvoch radov (Obr. 8). Práve vďaka zisteným polymorfným mikrosatelitom je možné zhodnotiť príbuznosť jedincov lebo tieto markery sa prenášajú z generácie na generáciu a amplifikujú sa medzi fylogeneticky bližšími jedincami.



**Obr. 8:** Taxonomické zaradenie takatry tmavej podľa Hacket *et al.* (2008), kde rody *Pelecanus*, *Scopus* a *Balaeniceps* sú v sesterskom vzťahu s rodmi *Eudocimus*, *Cochlearius* a *Ardea*.

Zaujímavé by bolo otestovať mikrosatelity od člnozobca kráľovského, ktoré však neboli pre tento druh doposiaľ navrhnuté. Tento druh je považovaný za priameho príbuzného takatry, čím by sa potvrdila alebo vyvrátila ich príbuznosť.

Pre presnejšie zaradenie tohto vtáka do konkrétneho radu a rozhodnutie o jeho príbuznosti, by bolo potrebné otestovať viac mikrosatelitov od príbuzných druhov na viacerých nepríbuzných jedincoch takatry. Avšak je problematické získať dostatočný počet vzoriek od nepríbuzných jedincov keďže je to africký druh a nachádza sa iba v niekoľkých zoológických záhradách.

## 7 Záver

Vo svojej bakalárskej práci som celkovo otestovala 386 párov primerov od príbuzných aj nepríbuzných druhov vodných vtákov technikou *cross-species* PCR amplifikácie. Cieľom tejto práce bolo nájsť polymorfne mikrosatelitové lokusy pre takatru tmavú. Využila som DNA získanú od dvoch nepríbuzných jedincov a zo štyroch jedincov voči týmto dvom tak isto nepríbuzným. Tieto štyri jedince sú vo vzťahu rodičia a ich dve mláďatá. Krv bola odobraná v ZOO Dvůr Králové z jedincov pôvodom z dvoch nepríbuzných chovov zo ZOO Arnhem a ZOO Amsterdam z Holandska. Po testovaní som mikrosatelitom, ktoré poskytli polymorfny produkt ďalej upravila čas elektroforetickej separácie a teplotu annealingu. Z príbuzných radov veslonožce amplifikovalo polymorfne lokusy 13 mikrosatelitov, z radu brodivce 7 mikrosatelitov, z radu plameniaky dva mikrosatelity a od nepríbuzných radov som amplifikovala iba jeden mikrosatelit a to z radu zúbkozobce. Zistené polymorfne mikrosatelity môžu byť ďalej použité pre analýzu paternity u takatry tmavej (*Scopus umbretta*). Z údajov, ktoré som získala v praktickej časti je takatra priama príbuzná s radom veslonožce a takisto podľa amplifikovaných polymorfných mikrosatelitov je vzdialenejšia príbuzná s brodivcami a plameniakmi, ale nepríbuzná s potápkami a potápliacami.



## 8 Zoznam skratiek

A	adenín
bp	pár báz ( <i>base pairs</i> )
C	cytozín
dATP	deoxyriboadenozín trifosfát
dCTP	deoxyribocytidín trifosfát
dGTP	deoxyriboguanozín trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dTTP	deoxyribotymidín trifosfát
EPP	mimopárová paternita ( <i>extra – pair paternity</i> )
EST	miesta zo sekvenčnou adresou ( <i>expressed sequence tags</i> )
G	guanín
LINEs	dlhé rozptýlené repetície ( <i>long interspersed element</i> )
PCR	polymerázová reťazová reakcia
RNA	Ribonukleová kyselina
SINEs	krátke rozptýlené repetície ( <i>short interspersed element</i> )
SSCP	jednoreťazcový konformačný polymorfizmus ( <i>Single-strand conformation polymorphism</i> )
SSRs	repetície jednoduchých sekvencií ( <i>simple sequence repeats</i> )
STRs	krátke tandemové repetície ( <i>short tandem repeats</i> )
T	tymín
T <sub>a</sub>	teplota annealingu

## 9. Použitá literatura

**Alderton D (1995)** Ptáci : Ptáci celého světa a jejich život ve své úžasné rozmanitosti. Nakladatelský dům OP, Praha.

**Angers B, Estoup A, Jarne P (2000)** Microsatellites size homoplasy, SSCP, and population structure: a case study in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1926-1932.

**Anmarkrud JA, Kleven O, Bachmann L, Lifjeld JT (2008)** Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus *HrU10*. *BMC Evolutionary Biology* 8, 138.

**Anonymous (2012)** Hamerkop *Scopus umbretta*. ([www.birdlife.org](http://www.birdlife.org)) navštívené 24.3.2012.

**Arcot SS, Wang Z, Weber JL, Deininger L, Batzer MA (1995)** Alu repeats: A source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics* 29, 136-144.

**Armour JAL, Neumann R, Gobert S, Jeffreys AJ (1994)** Isolation of human simple repeat loci by hybridisation selection. *Human Molecular Genetics* 3, 599-605.

**Bachtrog D, Agis M, Imhof M, Schlötterer Ch (2000)** Microsatellite Variability Differs Between Dinucleotide Repeat Motifs-Evidence from *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1277-1285.

**Bachtrog D, Weiss S, Zangerl B, Brem G, Schlötterer C (1999)** Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. *Molecular Biology and Evolution* 16, 602-610.

**Barlow EJ, Telford A, Daunt F, Cavers S (2010)** Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources* 10, 1098-1105.

**Birkhead TR, Pellatt JE, Hunter FM (1988)** Extra-pair copulation and sperm competition in the zebra finch. *Nature* 334, 60-62.

**Bois P, Jeffreys AJ (1999)** Minisatellite instability and germline mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 1636-1648.

**Bolsover SR, Hyams JS, Shepard EA, White HA, Wiedemann CG (2004)** Cell biology, 2nd edition. Wiley Liss, New Jersey.

**Brown, Urban, Newman (1982)** The Birds of Africa, volume 1. Academic Press, London.

**Burianová E (2011)** Analýza a charakteristika polymorfních cross-species mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce, depon. in Knihovna biologických oborů, PřF UPOL, Olomouc.

**Cahlíková R (2011)** Analýza a charakteristika polymorfních cross-species mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Diplomová práce, depon. in Knihovna biologických oborů, PřF UPOL, Olomouc.

**Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC (1993)** Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *American Journal of Humman Genetics* 52, 922–927.

**Campbell NA, Reece JB (2006)** Biologie. Computer Press a.s., Brno.

**Cipriani G, Lot G, Huang WG, Matarazzo MT, Peterlunger E, Testolin R (1999)** AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation, characterisation and cross species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 99, 65-72.

**Cowles RB (1930)** The Life History of *Scopus umbretta bannermani* C. Grant in Natal South Africa. *The Auk*, 47, 159-176.

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

**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 (2008)** 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.
- 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.
- Economou EP, Bergen AW, Warren AC, Antonarakis SE (1990)** The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive element is polymorphic in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87, 2951-2954.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M (2002)** Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.
- Faircloth BC, Ramos A, Drummond H, Gowaty PA (2009)** Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *Conservation Genetic Resources* 1, 159-162.
- Field D, Wills C (1998)** Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 263, 209-215.
- Fike JA, Devault TL, Rhodes OE (2009)** Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Genetic Resources Note* 9, 1183-1185.
- Fridolfsson A K, Ellegren H (1999)** A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 20, 116-121.
- Gaisler J, Zima J (2007)** Zoologie obratlovců. Academia, Praha

- Geraci J, Gaillard M, Bechet A, Cezilly F, Wattier RA (2010)** Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG (1998)** A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7, 1071-1075.
- Griffith SC, Owens IPF, Thuman KA (2002)** Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* 11, 2195-2212.
- Guay PJ, Mulder RA (2005)** Isolation and characterization of microsatellite markers in musk duck (*Biziura lobata*: Aves), and their application to other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 5, 249-252.
- Gutierrez MV, Vaz Patto CMC, Huguet CT, Cubero J I, Moreno CMT, Torres CAM (2005)** Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 1210-1217.
- Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL (2008)** A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763-1768.
- Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T (1982)** A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 79, 6465-6469.
- Hancock JM (1999)** Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein D, Schlötterer C. (Eds). *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, New York, 351-353.
- He LP, Wan QH, Fang SG, Xi YM (2006)** Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics* 7, 157-160.
- Hearne CM, Ghosh S, John A (1992)** Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics* 8, 288-294.
- Hickman CR, Peters MB, Crawford NG, Hagen C, Glenn TC, Somers 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 (2010)** Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* 3, 13-15.
- Hoyo, Elliott, Sargatal (1992)** Handbook of the Birds of the World, vol.1. Lynx Edicions, Devon.
- 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.
- Humeau L, da Silva D, Guérin F, Jaquement S, Requier JB, le Corne M (2010)** Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Phaethon lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Chakraborty R, De Andrade M, Daiger SP, Budowle B (1992)** Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics* 56, 45-57.
- Chang Q, Xie Z (2009)** Microsatellite loci developed for black-crowned night heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservation Genetics* 10, 1537-1539.
- Chmelářová A (2012)** Charakteristika polymorfních cross-species mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) a pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Diplomová práce, depon. in Knihovna biologických oborů, PřF UPOL, Olomouc.
- Isagi Y, Suhandono S (1997)** PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology* 6, 897-899.
- Ji YJ, Liu YD, Ding CQ, Zhang DX (2004)** Eight polymorphic microsatellite loci for the 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.

- Kennedy GC, German MS, Rutter WJ (1995)** The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nature Genetics* 9, 293-298.
- Kovalik P, Pačenovský S, Čapek M, Topercer J (2010)** Odporúčané Slovenské názvoslovie vtákov sveta. Slovenská ornitologická spoločnosť, Bratislava.
- Kruglyak S, Durrett RT, Schug Mand Aquadro CF (1998)** Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceeding of National Academy of Sciences of the USA* 95, 10774-10778.
- La Rota M, Kantety RV, Ju-Kyung Yu, Sorrells ME (2005)** Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat, and barley. *BMC Genomics* 2005 6, 23.
- Livezey BC, Zusi RL (2007)** Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. *Zoological Journal of the Linnean Society* 149, 1-95.
- Maak S, Neumann K, von Lengerken G, Gattermann R (2000)** First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics* 3, 233.
- 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.
- Manor H, B Sridhara Rao, RG Martin (1988)** Abundance and degree of dispersion of genomic d(GA)<sub>n</sub> z d(TC)<sub>n</sub> sequences. *Journal of Molecular Evolution* 27, 96-101.
- 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.
- McMillan AM, Bagley MJ, Evers DC (2004)** Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). *Molecular Ecology Notes* 4, 297-299.

- Mercer DM, Haig SM, Mullins TM (2010)** Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources* 2, 119-121.
- Møller AP (1986)** Mating systems among European passerines: a review. *Ibis* 128, 134-250.
- Møller AP, Birkhead TR (1993)** Cuckoldry and sociality: a comparative study of birds. *American Naturalist* 142, 118-140.
- 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*, preprint.
- Morton ES, Stutchbury BJM, Howlett JS, Piper WH (1998)** Genetic monogamy in blue-headed vireos and a comparison with a sympatric vireo with extrapair paternity. *Behavioral Ecology* 9, 515-524.
- Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E (1987)** Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1616-1622.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006)** Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294-307.
- Owens IPF, Hartley IR (1998)** Sexual dimorphism in birds: why are there so many different forms of dimorphism? *Proceedings of the Royal Society, London, Series B* 265, 397-407.
- Pashley CH, Ellis JR, McCauley DE, Burke JM (2006)** EST Databases as a Source for Molecular Markers: Lessons from Helianthus. *Journal of Heredity* 97, 381-388.
- Paulus KB, Tiedemann R (2003)** Ten polymorphic autosomal microsatellite loci for the Eider duck *Somateria mollissima* and their cross-species applicability among waterfowl species (Anatidae). *Molecular Ecology Notes* 3, 250-252.



- Piertney SB, Goostrey A, Dallas JF, Carss DN (1998)** Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology* 7, 138-140.
- Peters JL, (1979)** Check-list of Birds of the World, vol. I to XV, Harvard University Press Cambridge, Massachusetts, Peters JL (Eds.) (Museum of Comparative Anatomy, Cambridge, MA, 1931 to 1979).
- Preston, E, L (2005)** Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Ph.D. dissertation, University of North Texas, USA.
- Primmer CR, Merilä J (2000)** A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics* 3, 445-449.
- Primmer CR, Møller AP, Ellegren H (1996)** Wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5, 365-378.
- 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.
- Santos MS, Gonçalves EC, Barbosa MSR, Silvia A, Schnieder, MPC (2006)** Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* - Threskiornithidae - Aves). *Molecular Ecology Notes* 6, 307-309.
- Sasch JL, Hughes CR (1999)** Characterization of microsatellite loci for red-necked grebes *Podiceps grisegena*. *Molecular Ecology* 8, 687-688.
- Sawyer GM, Benjamin RC (2006)** Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes* 6, 677–679.
- Seutin G, White BN, Boag PT (1991):** Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69, 82-90.

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

**Sibley CG, Monroe BL Jr. (1990)** Distribution and Taxonomy of Birds of the World. Yale University Press, New Haven, Connecticut.

**Singer D (2008)** Vtáky - Ottov sprievodca prírodou. Ottovo nakladateľstvo, Bratislava.

**Slate J, Hale MC, Birkhead TR (2007)** Simple sequence repeats in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) expressed sequence tags: a new resource for evolutionary genetic studies of passerines. *BMC Genomics* 8, 52.

**Smith ND (2010)** Phylogenetic Analysis of Pelecaniformes (Aves) Based on Osteological Data: Implications for Waterbird Phylogeny and Fossil. *PLoS One* 5, e13354.

**Snustad DP, Simmons MJ (2009)** Genetika. Muni Press, Brno.

**Stai SM, Hughes CR (2003)** Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics* 5, 387-389.

**Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD (1993)** Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365, 274-276.

**Svensson L, Grant PJ (2004)** Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého východu. Svojtka & CO, Praha.

**Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V (2005)** Metody molekulární biologie. Vydavatelství MU, Brno.

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

**Taylor SA, Morris-Pocok 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* 15, 525-528.

- Tomasulo- Seccomandi AM, Schable NA, Bryan AL, Brisbin IL JR, Del Lama SN, Glenn TC (2003)** Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3, 563-566.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000)** Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- Van Den Bussche, RA, JL Longmire, RJ Baker (1995)** How bats achieve a small C-value: Frequency of repetitive DNA in *Macrotus*. *Mammalian Genome* 6, 521-525.
- Van Den Bussche RA, Harmon SA, Baker RJ, Bryan AL, Rodgers JA JR, Harris MJ, Brisbin IL JR (1999)** Low levels of genetic variability in North American populations of the wood stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 116, 1083-1092.
- Vergnaud G, Denoeud F (2000)** Minisatellites: Mutability and Genome Architecture. *Genome Research* 10, 899-907.
- Veselovský Z (2001)** Obecná ornitologie. Academia, Praha.
- Wachtel SS, Tiersch TR (1993)** Variations in genome mass. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104B, 207-213.
- Walsh PS, Fildes NJ, 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.
- Westneat DF (1990)** Genetic parentage in the indigo bunting: a study using DNA fingerprinting. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 27, 67-76.
- Westneat DF, Sherman PW (1997)** Density and extra-pair fertilizations in birds: a comparative analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 41, 205-215.
- Wilder J, Hollocher H (2001)** Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Molecular Biology and Evolution* 18, 384-392.

**Wink M, Dyrce A (1999)** Mating systems in birds: a review of molecular studies. *Acta Ornithologica* 34, 91-109.

**Wyman AR, White R, (1980)** A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 77, 6754-6758.

**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.

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