

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2011**

**Barbora Málková**

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



**Analýza vybraných polymorfních *cross-species*  
mikrosatelitů pro determinaci paternity u ibise rudého  
(*Eudocimus ruber*)**

**Bakalářská práce**

**Barbora Málková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2011**

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

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

V Olomouci dne .....

.....

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho čas, trpělivost, odborné rady a materiály, které mi poskytl při vypracování této bakalářské práce, a také kolektivu v laboratoři populační genetiky.

## Souhrn

Ibis rudý (*Eudocimus ruber*) je středně velký, rudě zbarvený pták vyskytující se především v Jižní Americe. Dosud bylo pro tento druh nalezeno deset polymorfních mikrosatelitových markerů.

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala hledáním dalších polymorfních mikrosatelitových lokusů vhodných pro využití v paternitních studiích u ibise rudého pomocí *cross-species* primerů, které byly odvozeny z DNA taxonomicky příbuzných druhů ptáků z řádů plameňáci (Phoenicopteriformes) a veslonozí (Pelecaniformes).

Z celkového počtu 181 mikrosatelitových lokusů, které jsem testovala na 6 nepříbuzných jedincích ibise rudého, jsem našla 21 polymorfních. Počet alel se pohyboval se v rozmezí 2 až 6. Průměrný počet alel na lokus byl 2,65.

## Summary

Scarlet Ibis (*Eudocimus ruber*) is medium size red coloured bird, occurring mainly in the South America. So far has been found ten microsatellite markers for this species.

In my bachelor thesis I dealt with the search for polymorphic microsatellite loci, suitable for paternity studies of the scarlet ibis using cross-species primers, which were isolated from DNA of taxonomically related species of birds from orders Phoenicopteriformes and Pelecaniformes.

From the total number of 181 tested microsatellite loci, which I tested on six unrelated individuals of scarlet ibis, I discovered 21 polymorphic. Number of alleles ranged 2 to 6. The average number of alleles per locus was 2,65.

# Obsah

<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>8</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>9</b>
3.1 BRODIVÍ .....	9
3.1.1 <i>Ibisovití</i> .....	11
3.1.2 <i>Ibis rudý (Eudocimus ruber)</i> .....	12
3.2 PARTNERSKÉ SVAZKY A MIMOPÁROVÉ CHOVÁNÍ U PTÁKŮ .....	14
3.2.1 <i>Výhody a nevýhody mimopárových kopulací</i> .....	15
3.3 REPETITIVNÍ DNA.....	16
3.3.1 <i>Rozptýlená repetitivní DNA</i> .....	16
3.3.1.1 DNA transpozóny .....	17
3.3.1.2 Retrotranspozóny .....	17
3.3.2 <i>Tandemově uspořádaná repetitivní DNA</i> .....	17
3.3.2.1 Satelity .....	18
3.3.2.2 Minisatelity .....	18
3.3.2.3 Mikrosatelity .....	19
3.3.2.4 Mikrosatelity v genomu ptáků .....	20
3.3.2.5 Izolace mikrosatelitů <i>de novo</i> .....	21
3.3.2.6 <i>Cross-species</i> amplifikace mikrosatelitů .....	22
3.4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE .....	22
3.4.1 <i>Složení PCR mixu</i> .....	22
3.4.2 <i>Průběh PCR</i> .....	23
3.4.3 <i>Analýza PCR produktu</i> .....	24
3.4.4 <i>Problémy při analýze PCR produktu</i> .....	24
3.4.4.1 Nulové alely .....	24
3.4.4.2 <i>Stutter</i> bandy .....	25
3.4.4.3 Alelová homoplazie .....	25
<b>4 MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>27</b>
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	27
4.2 PCR AMPLIFIKACE DNA.....	27
4.3 ZPRACOVÁNÍ PCR PRODUKTŮ.....	30
4.4 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY .....	32
4.4.1 <i>Použité chemikálie</i> .....	32
4.4.2 <i>Použité roztoky</i> .....	33
4.5 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE .....	34
<b>5 VÝSLEDKY .....</b>	<b>36</b>
<b>6 DISKUZE .....</b>	<b>42</b>
<b>7 ZÁVĚR .....</b>	<b>48</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>49</b>
<b>9 POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>50</b>

# 1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké repetitivní úseky DNA o délce jednotky 1 až 6 bp. Pro svou mutační rychlost a s ní související vysokou míru délkového polymorfismu jsou optimálními molekulárními markery pro genetické populační studie. Pro hledání nových mikrosatelitových markerů lze využít dvě strategie: izolaci *de novo* z genetické knihovny studovaného druhu, nebo *cross-species* amplifikaci pomocí primerů navržených pro příbuzné druhy.

V této bakalářské práci se zabývám hledáním nových polymorfních mikrosatelitových lokusů u ibise rudého (*Eudocimus ruber*) metodou *cross-species* amplifikace s využitím primerů izolovaných od zástupců řazených do řádů plameňáci (*Phoenicopteriformes*) a veslonozí (*Pelecaniformes*). Jednotlivé mikrosatelitové lokusy budou testovány na DNA šesti nepříbuzných jedinců ibise rudého pomocí PCR amplifikace a následné elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu.



## 2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných zdrojů a vypracování literární rešerše na téma analýza vybraných *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u ibise rudého.
2. Provedení PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů s využitím *cross-species* primerů, které jsou známé od taxonomicky příbuzných druhů ptáků z řádů veslonozí a plameňáci za účelem zjištění jejich polymorfismu u ibise rudého.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Brodiví

Do řádu brodiví (Ciconiiformes) se tradičně řadí čeledi čápoovití (Ciconiidae), člunozobcovití (Balaenicipitidae), ibisovití (Threskiornithidae), kladivoušovití (Scopidae) a volavkovití (Ardeidae) (Šťastný *et* Bejček, 1998). Tak jako u mnoha jiných řádů se o taxonomické příslušnosti jednotlivých čeledí stále vedou spory. Molekulární metody ukazují příbuznost jedinců řádu brodiví s kondory, kteří byli tradičně řazeni do řádu dravců a také s pelikány (Hedges *et* Sibley, 1994). Podle Hackett *et al.* (2008) je do řádu brodiví řazena pouze čeleď čápoovití, ostatní čeledi jsou řazeny do řádu veslonozí (Pelecaniformes).

Druhy z řádu brodiví jsou středně velcí až velcí ptáci vyskytující se s výjimkou polárních oblastí po celém světě (Hanzák *et* Hudec, 1963). Jsou přizpůsobeni pro lovení či sbírání živočišné potravy v mělké bahnitě vodě (Gaisler *et* Zima, 2007).

Charakteristickým znakem ptáků z řádu brodiví jsou dlouhé nohy, které jim umožňují pohyb – brodění – v mělké vodě (Hanzák *et* Hudec, 1963). Mají nízko nasazený, dobře vyvinutý palec a některé druhy navíc kožní lem mezi třemi prsty směřujícími dopředu. Obojí zvětšuje nášlapnou plochu nohy a brání tak propadání do bahna (Šťastný *et* Bejček, 1998; Gaisler *et* Zima, 2007; Burnie *et al.*, 2008). Běhák a dolní část holeně jsou lysé (Churý *et al.*, 1966). Druhy s kratšíma nohama nebrodí vodu, na kořist číhají na větvích u hladiny (Šťastný *et* Bejček, 1998).

Tvar zobáku souvisí s druhem potravy a se způsobem jejího sběru. Většinou je dlouhý, úzký a ostrý u volavek a čápů často tvarem připomíná harpunu. U ibisů je dlouhý, srpovitě zahnutý dolů, u kolpíků na špičce lžícovitě rozšířený (Cogger *et al.*, 1994; Burnie *et al.*, 2008).

Velikost těla se u jednotlivých druhů může značně odlišovat. Nejmenším zástupcem je bukáček malý (*Ixobrychus minutus*), jehož celková délka bývá 27 až 36 cm a hmotnost 46 až 85 g, největšími zástupci pak volavka obrovská (*Ardea goliath*) o celkové délce 1,4 až 1,5 m a marabu africký (*Leptoptilos crumeniferus*) s rozpětím křídel až 3,2 m a hmotností 9 kg (Cogger *et al.*, 1994; Burnie *et al.*, 2008).

V opeření se často vyskytují holá místa, různé výrůstky a prodloužená ozdobná pera, zejména na hlavě a krku. Zbarvení u obou pohlaví je stejné, nebo se liší jen málo. Samice obvykle bývají o něco menší a mají méně vyvinutá ozdobná pera. Mláďata mohou vyhlížet odlišně (Šťastný *et* Bejček, 1998).

Brodiví jsou masožraví ptáci. Živí se vodními živočichy, převážně drobnými obojživelníky, hmyzem, rybami, některé druhy i malými ptáky. Kořist obvykle loví prudkým vysunutím zobáku vpřed (Burnie *et al.*, 2002). K získávání potravy využívají mnoho technik, od tichého číhání na okraji mokřadu, přes víření vody a šustění trávou, aby svou kořist vyplašili a překvapili, až po rychlou chůzi přes mokřinu (Burnie *et al.*, 2008). Suchozemské druhy nepohrdnou ani mršinami a parazity na tělech velkých zvířat. Některé druhy krouží a pátrají po zdechlinách podobně jako supi (Šťastný *et* Bejček, 1998; Burnie *et al.*, 2008). Mají třídílný žaludek, vole obvykle chybí (Gaisler *et* Zima, 2007).

Všechny druhy z řádu brodiví výborně létají, mohou dosahovat rychlosti až 57 km/hod. Mají dlouhá, široká křídla, která jim umožňují plachtění za využití teplých proudů vznikajících nad pevninou. Za potravou létají obvykle do 20 km od místa hnízdiště, při nedostatku potravy se však mohou vzdálit i 60 km (Churý *et al.*, 1966; Šťastný *et* Bejček, 1998). Nohy mají za letu obvykle natažené. Čápi a ibisi mají při letu krk natažený dopředu, volavky létají s krkem esovitě protaženým na hřbet (Šťastný *et* Bejček, 1998).

Hlasové projevy jsou obvykle hlasité, často syčivé nebo drsné. U některých druhů jsou hlasové projevy nahrazeny nebo doplněny klapáním zobákem. Klapání obvykle tvoří trvalou zvukovou kulisu na hnízdních koloniích (Šťastný *et* Bejček, 1998).

Některé druhy žijí individuálně v trvalých párech, jiné v koloniích, často smíšených s jinými druhy. Hnízda si staví na stromech, keřích, v rákosí, v bažinách, ale i na skalách a stavbách. Mezi největší kolonie brodivých ptáků patří kolonie u Chagana v Tanzánii, kde žije 50 000 párů různých druhů nebo kolonie o 23 000 párů volavek v deltě Nigeru. Obecně platí, že jádra kolonií tvoří převážně bílí ptáci, tmavé formy častěji žijí osamoceně (Šťastný *et* Bejček, 1998).

Kladou obvykle 2 až 10 vajec do hnízda, doba vysezování se pohybuje od 16 do 38 dní (Šťastný *et* Bejček, 1998). Sedí již od prvního vejce, takže se mláďata líhnou

postupně (Gaisler *et Zima*, 2007). Mláďata jsou nidikolní, na krmení se podílejí oba rodiče. Z hnízda vylétají obvykle po 1 měsíci až 115 dnech, ale například bukáčci opouštějí hnízdo ještě před dosažením vzletnosti, už od 10. dne života. Pohlavní dospělosti dosahují mezi 1. a 5. rokem (Šťastný *et* Bejček, 1998, Burnie *et al.*, 2008).

Řád brodiví zahrnuje 113 druhů, z nichž 13 se vyskytuje také na území České republiky. (Šťastný *et* Bejček, 1998).

### 3.1.1 Ibisovití

Do čeledi ibisovití (Threskiornithidae) jsou řazeni jedinci dvou na první pohled odlišných podčeledí. Jedná se o ibise a kolpíky. Ibisové a kolpíci jsou si velmi blízcě příbuzní (Hanzák *et* Hudec, 1963). Podčeleď ibisové zahrnuje 23 až 28 druhů ptáků v 11 až 14 rodech. Počty jednotlivých rodů i druhů jsou u různých autorů rozdílné. Do podčeledi kolpíci patří 6 druhů řazených obvykle do dvou rodů (Šťastný *et* Bejček, 1998; Ramel, 1999; Gill *et* Wright, 2006).

Jedinci z čeledi ibisovití jsou středně velcí ptáci. Mají dlouhé krky, které na rozdíl od čápů a volavek při letu drží natažené. Plachtí pouze zřídka. Mají dlouhé nohy se čtyřmi dlouhými prsty, z nichž tři přední jsou u kořene spojeny blankou (Hanzák *et* Hudec, 1963).

Vyvinuli se před více než 25 miliony lety v Severní Americe. Byly nalezeny fosilie ibise hnědého, ibise andského a ibise amerického datované do miocénu a také fosilie dvou nelétavých druhů: *Apteribis glenoo* z Havaje a *Xenicibis xymptithecus* z Jamajky (Ramel, 1999).

Ibisové a kolpíci se na první pohled liší ve tvaru zobáku. Ibisové mají dlouhý, poměrně měkký zobák srpovitého tvaru, na průřezu kulatý. Zobák kolpíků je dlouhý, rovný, na špičce zploštělý a rozšířený (Šťastný *et* Bejček, 1998; Burnie *et al.*, 2008). Rozdíly jsou způsobeny odlišným způsobem získávání potravy. Zatímco ibisové dlouhým zobákem hledají potravu v měkkém bahně mělkých vod, kolpíci se krmí tak, že pohybují částečně otevřeným zobákem ze strany na stranu a pokud ucítí cokoli pevného, zobák rychle zavřou (Ramel, 1999). Ibisové i kolpíci jsou masožravci, primárně lovci. Kořist vyhledávají pomocí hmatu, loví tedy stejně dobře v noci jako ve

dne. Někteří ibisové využívají i zrak k lovení hmyzu kolem vody (Alderton, 1995; Burnie *et al.*, 2008).

Mnoho druhů má na hlavě hřebeny erektilních per, která se zvedají v době námluv. Chování při námluvách je u jednotlivých druhů odlišné, časté jsou obranné postoje nebo čechrání peří (Šťastný *et* Bejček, 1998, Ramel, 1999).

Hnízda si stavějí z větviček a rákosí, které na místo stavby přinášejí samci. Samice mezitím zajišťují většinu samotné stavby. Kladou obvykle kolem pěti vajec. Na jejich vysezování se podílejí oba rodiče. Mláďata jsou krmena vyvrácenou potravou z jícnu rodičů. Když jsou mláďata malá, zůstává vždy jeden z rodičů na hnízdě. Mláďata po vylíhnutí neumí stát a mají krátké zobáky, které však brzy začínají získávat tvar zobáků dospělých jedinců (Ramel, 1999). Když mláďata spadnou z hnízda do vody, jsou obvykle schopna doplavat zpět (Alderton, 1995).

Ačkoli ibisové a kolpíci jsou primárně vodní ptáci, některé druhy žijí v suchozemských biotopech, například ibis hagadeš (*Hagedashia hagedash*), ibis jihoafrický (*Geronticus casus*) a ibis skalní (*Geronticus eremita*) (Ramel, 1999).

Zejména v důsledku ničení přirozeného prostředí pro hnízdění dochází v posledních letech u některých druhů ke značnému početnímu úbytku. Na seznamu ohrožených druhů jsou ibis běloramenný (*Pseudibis davisoni*), ibis obrovský (*Thaumatibis gigantea*), ibis skalní (*Geronticus eremita*) a ibis svatomášský (*Bostrychia bocagei*) zařazeni mezi kriticky ohrožené (Anonymous, 2011a).

Většina druhů čeledi ibisovití žije v koloniích, ale existují i výjimky, například ibis čínský (*Nipponia nippon*), který hnízdí v izolovaných párech (Ramel, 1999).

Ibis posvátný (*Threskiornis aethiopicus*) se objevuje v mytologii starověkého Egypta jako symbol boha moudrosti Thowta. Ten byl často zobrazován právě s hlavou ibise a ibisové byli chováni i v jeho chrámech. Jejich mumifikované ostatky byly nalezeny ve zvláštních hrobkách (Alderton, 1995, Ramel, 1999).

### 3.1.2 Ibis rudý (*Eudocimus ruber*)

Systematické zařazení ibise rudého (del Hoyo *et al.*, 1992, Šťastný *et* Bejček, 1998).

Říše: živočichové (Animalia)

Kmen:	strunatci (Chordata)
Podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
Třída:	ptáci (Aves)
Nadřád:	letci (Neognathae)
Řád:	brodiví (Ciconiiformes)
Čeleď:	ibisovití (Threskiornithidae)
Podčeleď:	ibisové (Threskiornithinae)
Rod:	ibis ( <i>Eudocimus</i> )
Druh:	ibis rudý ( <i>Eudocimus ruber</i> )



Obrázek č. 1: Ibis rudý, dospělý jedinec

Zdroj: [http://filesdown.esecure.co.uk/wildlifepark/scarlet\\_ibis\\_2.jpg\\_25082008-1646-57.jpg](http://filesdown.esecure.co.uk/wildlifepark/scarlet_ibis_2.jpg_25082008-1646-57.jpg)

Ibis rudý bývá často nazýván také ibis nachový nebo šarlatový. Je to středně velký pták o délce těla 55 až 89 cm a rozpětí křídel 112 až 124 cm. Váží kolem 1,5 kg. Je považován za nejkrásnějšího z ibisů, dospělý pták má sytě rudou barvu, při chovu v zajetí však poněkud bledne (Hanzák *et* Hudec, 1963; Anonymous, 2011b). Vyskytuje se ve dvou formách – rudé a bílé, přičemž převládá forma rudá. Obě formy žijí vedle sebe ve společných koloniích, bílí jedinci tvoří s rudými smíšené páry (Hanzák *et* Hudec, 1963). Obvykle hnízdí v močálech, rýžových polích a při ústí řek, v mangrovech a na stromech. Často si vybírá otevřená prostředí (Burnie *et al.*, 2002).

Ibis rudý se vyskytuje v severní a severovýchodní části Jižní Ameriky, od Venezuely až po Brazílii. Zalétá do Střední Ameriky a na Antily (Hanzák *et* Hudec, 1963; Gosler *et al.*, 1994). Až do sedmdesátých let minulého století bylo nejznámější nocoviště ibisů rudých na ostrově Trinidadu, kam se slétala hejna z Venezuely přes mořskou úžinu (Hanzák *et* Hudec, 1963; Šťastný *et* Bejček, 1998).

Potravou jsou pro ibise rudého především vodní živočichové: korýši, měkkýši, malé rybky, žáby a vodní hmyz. Při lovu se spíše orientuje především pomocí hmatu. Obvykle chodí kolem vody a svým dlouhým zobákem prozkoumává měkké bahno, nebo podobně jako kolpík pohybuje zobákem ze strany na stranu (Burnie *et al.*, 2002).

Rozmnožuje se celoročně. Samice snáší obvykle 1 až 5 bílých nebo namodralých vajec, na kterých sedí 21-23 dny (Hanzák *et* Hudec, 1963; Anonymous, 2011b). Hnízdo je umístěné na plošince z klacíků na stromě. Mláďata jsou svrchu šedavě hnědá, s bílou kostrčí a spodní částí těla, které s věkem získává růžový nádech. Hlava a krk jsou bělavě hnědé (Gosler *et al.*, 1994). Ve volné přírodě se ibis rudý dožívá přibližně 15 let, v zajetí pak 25 let (Anonymous, 2011b).

### **3.2 Partnerské svazky a mimopárové chování u ptáků**

Ptáci mohou tvořit různé typy partnerských svazků. Nejčastějším je monogamie, ale existují i druhy polygamní a promiskuitní. Typ svazku a délka jeho trvání často závisí na ekologických podmínkách, délce hnízdní doby a potravní nabídce (Veselovský, 2001).

Až do osmdesátých let minulého století byly monogamní druhy ptáků dávány za vzor partnerské věrnosti. Pozdější analýzy DNA z krve mláďat však ukázaly, že ne všechna mláďata byla zplozena domnělým otcem. I u sociálně monogamních druhů dochází k mimopárovým kopulacím (*Extra-Pair Copulations, EPC*) a často také k mimopárovému oplození a paternitě (*Extra-Pair Paternity, EPP*). Pravá genetická monogamie byla nalezena u méně než 25 % sociálně monogamních druhů (Veselovský, 2001; Griffith *et al.*, 2002).

Mezi monogamními druhy ptáků byla nejvyšší míra EPP zaznamenána u strnada rákosního (*Emberiza schoeniclus*), kde až 55 % potomků pochází z mimopárových kopulací a 86 % hnízd obsahuje alespoň jednoho potomka zplozeného mimo pár. U

ptáků s kooperativní polyandrií, kdy několik samců a samic tvoří skupinu společně pečující o potomky, byla míra EPP, tedy procento potomků zplozených samcem nepatřícím do skupiny, až 72 %, a to u modroplášíka nádherného (*Malurus cyaneus*). Velmi nízká frekvence EPP byla zaznamenána u buňňáka ledního (*Fulmarus glacialis*) (Petrie *et* Kempnaers, 1998; Griffith *et al.*, 2002).

Podle Westneat *et* Stewart (2003), kteří shrnuli výsledky osmnácti srovnávacích studií, jsou nejdůležitějšími faktory ovlivňujícími rozdílnou míru EPP u jednotlivých druhů: fylogenetické faktory, četost páření, synchronizace páření, úmrtnost dospělých jedinců, rodičovská péče, rozdílné zbarvení samců a samic, genetická variabilita, velikost vzorku, míra zapojení samců do péče o potomky, pevnost párů, velikost snůšky, sociální systém páření, úspěšnost líhnutí, tělesná hmotnost, velikost pohlavního dimorfismu, pestrost samčího opeření, velikost varlat a délka spermií, přičemž v řadě případů není jasné, zda se jedná o příčiny či důsledky EPP.

Míra EPP se ovšem neliší pouze mezi rody ptáků, ale také mezi druhy jednoho rodu, mezi populacemi téhož druhu nebo i v rámci jedné populace v čase. Například u budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*) jedna studie ukazuje 0 % EPP, zatímco při jiné byla mimopárová mláďata nalezena až v 50 % hnízd (Petrie *et* Kempnaers, 1998). Zdá se, že mimopárové kopulace jsou méně časté u ostrovních populací a také populací, které prošly efektem hrdla lahve (Petrie *et* Kempnaers, 1998; Griffith *et al.*, 2002).

### **3.2.1 Výhody a nevýhody mimopárových kopulací**

Výhody plynoucí z EPC lze rozdělit na výhody pro samice a výhody pro samce. Samice se mimopárovými kopulacemi mohou bránit před inkubací neoplozených vajec v případě neplodnosti partnera. Kopulací s cizími zdatnými samci samice také zajišťuje „dobré geny“ pro své potomky a napomáhá tím šíření vlastních genů prostřednictvím „sexy-synů“. Dále samice získá dalšího, většinou mladého samce, který jí pomáhá s výchovou mláďat. V případě ztráty vlastního partnera má samice druhu s vyšší mírou EPC větší šanci na nalezení nového – často utvoří nový pár se samcem, s nímž má mimopárové potomky. Další výhodou je možnost získávat potravu na území jiného samce. Nevýhodou EPC je riziko ztráty vlastního partnera (Petrie *et* Kempnaers, 1998; Veselovský, 2001).



Zdatní samci si mimopárovými kopulacemi zvyšují počet svých mlád'at. Navíc rozprostření mlád'at do více hnízd zvyšuje jejich šance na přežití. Opuštění samice za účelem EPC ovšem zvyšuje riziko, že samici oplodní cizí samec a on ztratí výlučnou paternitu všech mlád'at. Navíc EPC mohou samce na čas zbavit spermií a on tak nemůže oplodnit vlastní samici (Veselovský, 2001).

### **3.3 Repetitivní DNA**

Zatímco genomy prokaryontních buněk obsahují především DNA kódující proteiny, tRNA či rRNA, velkou část genomu eukaryot tvoří DNA nekódující (Campbell *et* Reece, 2007). Kódující i nekódující DNA může být buď unikátní, nebo se v genomu vyskytovat ve více identických nebo podobných kopiích. Sekvence, které se vyskytují ve velkém množství kopií, se označují jako repetitivní DNA (Šeda *et al.*, 2006).

Repetitivní sekvence se mohou dělit na dva typy, podle toho, zda jsou jednotky opakování rozptýleny jednotlivě v genomu (rozptýlená repetitivní DNA), nebo uspořádány tandemově za sebou (satelitní DNA).

#### **3.3.1 Rozptýlená repetitivní DNA**

Rozptýlená repetitivní DNA je tvořena sekvencemi, které jsou roztroušeny po genomu v jednotlivých kopiích. Tyto sekvence jsou si velmi podobné, ale nejsou zcela identické. Délka repetice obvykle pohybuje od 100 do 1000 bp (Campbell *et* Reece, 2007). Rozptýlené repetice vznikají funkcí transponovatelných genetických elementů, tzv. transpozónů. Transpozóny se mohou pohybovat v rámci genomu. Podle charakteru pohybu je lze dělit do dvou skupin, a to na DNA transpozóny, pohybující se procesem transpozice a retrotranspozóny, které se pohybují procesem retropozice (Šeda *et al.*, 2006).

### 3.3.1.1 DNA transpozóny

DNA transpozóny jsou elementy, které mají schopnost přeskakovat z jednoho místa na jiné v rámci genomu. Jsou charakteristické přítomností obrácených koncových repetit (Inverted Terminal Repeat, *ITR*) a obvykle také kódují enzym transpozázu.

Transpozáza umožňuje vyštěpení DNA transpozónu z původního místa na DNA a následně jeho integraci do specifického sekvenčního motivu jinde v genomu. Přitom dochází k duplikaci cílového místa (*Target Site Duplication, TSD*). Počet kopií transpozónu tedy zůstává stabilní, ale dochází ke zvyšování počtu kopií cílového místa pro jeho transpozici (Šeda *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2007).

### 3.3.1.2 Retrotranspozóny

Retrotranspozóny na rozdíl od DNA transpozónů nejsou z původního místa na chromozomu vyštěpovány. Pomocí buněčných polymeráz jsou přepsány do RNA a následně pomocí reverzní transkriptázy zpět do DNA a vloženy na jiné místo v genomu. Počet kopií tedy roste, ale většina z nich bývá inaktivována delecemi a bodovými mutacemi. Podobně jako u DNA transpozónů i u retrotranspozónů dochází k duplikaci cílového místa (Šeda *et al.*, 2006).

### 3.3.2 Tandemově uspořádaná repetitivní DNA

Tandemové repetice jsou tvořeny identickými nebo téměř identickými jednotkami opakovanými uspořádanými v řadě za sebou. Bývají označovány také jako satelitní DNA nebo VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) (Busxgiazzo, 2006; Campbell *et al.*, 2007). Podle délky je lze rozdělit na satelity, minisatelity a mikrosatelity.

Název satelitní DNA souvisí s jejím objevením. Když byla genomická DNA naštipána a centrifugována v hustotním gradientu, tvořila tandemově repetitivní DNA proužek – satelit – který byl od ostatní DNA oddělen. Důvodem je odlišná vnitřní hustota úseků obsahujících tandemové repetice (Bennet, 2000; Campbell *et al.*, 2007).

### 3.3.2.1 Satelity

Satelity jsou typem tandemových repetic s nejdelšími jednotkami repetice. Neexistují žádné všeobecně přijímané velikostní limity, často se však uvádí délka primární jednotky od 5 bp až po několik stovek párů bazí (Koreth *et al.*, 1996; Bennett, 2000; Šeda *et al.*, 2006). Primární jednotky bývají degenerované, s určitými nepravidelnostmi, které se mohou periodicky opakovat a tvořit sekundární jednotky. Satelity tvoří bloky o délce až 100 Mb. Lze je nalézt v heterochromatinu, nejčastěji v oblastech centromer (Bennett, 2000; Šeda *et al.*, 2006). Nejsou tak variabilní, co se týká délky, jako ostatní typy tandemových repetic. Vzhledem k jejich velikosti a lokalizaci nemají satelity v genetických studiích žádné reálné využití (Bennet, 2000).

### 3.3.2.2 Minisatelity

Minisatelitová DNA se skládá ze středně dlouhých repetic. Délka základní jednotky opakování je 6 až 100 bp (Ramel, 1997; Vergnaud *et Denoeud*, 2000), délka jednoho bloku pak bývá od 100 bp do 20 kb (Bennett, 2000).

Minisatelity lze dělit do dvou skupin, a to na telomerové a hypervariabilní. Telomerová minisatelitová DNA sestává z úseků dlouhých 10 až 15 kb a jak již její název napovídá, vyskytuje se na telomerách chromozomů. Tato DNA chrání konce chromozomů před degradací a umožňuje jejich úplnou replikaci. Také hraje roli při párování a orientaci chromozomů během buněčného dělení (Bennett, 2000).

Hypervariabilní minisatelity jsou velice polymorfní co do počtu opakování jednotek repetice na jednom lokusu a tedy mohou být využity jako genetické markery. Jsou však příliš dlouhé pro efektivní PCR amplifikaci, proto je nutné provádět jejich analýzu pomocí Southern blottingu nebo MVR (*Minisatellite Variant Repeat*) metody PCR. Z toho důvodu obliba minisatelitů coby genetických markerů klesá (Ramel, 1997; Bennet, 2000; Šeda *et al.*, 2006).

Minisatelitové repetice působí jako *hot spots* pro homologní rekombinaci. Rekombinace, zejména nerovnoměrný crossing-over a nerovnoměrná výměna úseku mezi sesterskými chromatidami je příčinou jejich vysoké variability mezi jedinci (Bennet, 2000).

Minisatelity se využívají v soudním lékařství, jako prostředek pro určování příbuznosti, včetně otcovství a také jako markery pro studium vazby v genových analýzách (Ramel, 1997).

### 3.3.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity, nebo také SRTs (*Short Tandem Repeats*) či SSRs (*Single Sequence Repeats*) jsou opakující se jednoduché sekvenční motivy dlouhé zpravidla 2 až 6 bp, které jsou vysoce polymorfní (Zima *et al.*, 2004). Polymorfismus mikrosatelitových sekvencí nespočívá ve variabilitě v primární sekvenci, ale v počtu opakování jednotky repetice (Ellegren, 2004). Počet repetitivních jednotek je přímo závislý na jejich délce. Obecně platí, že počet opakování klesá se zvyšující se délkou jednotky. Délka jednoho bloku bývá obvykle kolem 100 bp (Bennett, 2000; Chambers *et MacAvoy*, 2000).

Mikrosatelity jsou nejlépe prozkoumány u člověka a hospodářských zvířat, u jiných organismů byla často studována pouze určitá část mikrosatelitových lokusů za konkrétním účelem a u řady druhů nebyly dosud mikrosatelity zkoumány vůbec. Nicméně lze říci, že mikrosatelitové lokusy jsou delší a častější u obratlovců než u bezobratlých a že mezi obratlovci mají poikiloternní živočichové, jako želvy, delší soubory repetice než živočichové homoioternní (Chambers *et MacAvoy*, 2000).

Mikrosatelity vznikají v oblastech, kde už jsou repetitivní jednotky přítomné. Zdaleka nejčastějším mechanismem vzniku je sklouznutí DNA-polymerázy během replikace. Zda dojde ke zvýšení či snížení počtu jednotek repetice závisí na sekvenci repetice a na tom, na kterém vlákně dojde ke vzniku vlásenky (Ramel, 1997; Chambers *et MacAvoy*, 2000). Pokud se jedná o nové vlákno, je výsledný efekt aditivní, pokud vlásenka vznikne na templátovém vlákně, dojde k odstranění vlásenky enzymy a výsledným efektem je ztráta jedné nebo více jednotek (Bennett, 2000). Akumulace repetitivních jednotek znamená zvýšené riziko homologní rekombinace mezi chromozomálními segmenty a může dojít translokaci, delecii či inverzi, tedy opět ke zvýšení či snížení počtu jednotek opakování (Ramel, 1997).

Mikrosatelitové lokusy jsou v genomu poměrně rovnoměrně rozloženy. Vyskytují se především v nekódujících oblastech, mezi geny a v intronech, ale některé trinukleotidové sekvence se mohou vyskytovat i v oblastech kódujících. Tyto sekvence

často nesou kód pro aminokyselinu glutamin a jsou součástí oblastí kódujících proteiny zapojené do transkripce (Bennett, 2000; Chambers *et MacAvoy*, 2000; Ellergen, 2004).

Změny v počtu určitých mikrosatelitových repetic jsou u člověka spojovány s výskytem některých závažných onemocnění. Jedná se například o syndrom fragilního chromozomu X, Huntingtonovu chorobu, myotonickou dystrofii či spinocerebrální ataxii (Zima *et al.*, 2004; Campbell *et Reece*, 2006).

Nejčastěji se vyskytující mikrosatelitovou sekvencí u člověka, je poly-(A)/poly-(T). Dále jsou to dinukleotidové sekvence, z nichž nejfrekventovanější je u savců (AC)<sub>n</sub>/(TG)<sub>n</sub> u rostlin pak (AT)<sub>n</sub>. Mezi trinukleotidy jsou nejčastější (CAG)<sub>n</sub> a (AAT)<sub>n</sub> (Ellergen, 2004; Zima *et al.*, 2004).

Mikrosatelity si díky svým vlastnostem získaly značnou oblibu jako genetické markery. Důležitá je jejich vysoká proměnlivost, a to i u druhů pro alozymové lokusy prakticky monomorfních. Jsou kodominantní, lokusy jsou rozprostřeny po celém genomu a v neposlední řadě je lze snadno analyzovat pomocí PCR a elektroforetické separace (Zima *et al.*, 2004).

Využívají se v medicíně při testech na onemocnění související s trinukleotidovými repeticemi, při analýze vazbových skupin, forenzních analýzách, testování paternity, určování velikosti a struktury populace, genetické proměnlivosti, toku genů, ke studiu charakteru a dynamiky hybridních zón, atd. (Bennett, 2000; Zima *et al.*, 2004).

#### **3.3.2.4 Mikrosatelity v genomu ptáků**

Ptáci obecně mají menší genomy než většina obratlovců. Malý obsah DNA souvisí s malou velikostí buněk a vysokou úrovní bazálního metabolismu a pravděpodobně je součástí adaptace k létání, což podporuje malá velikost genomu netopýrů ve srovnání s ostatními savci (Gregory, 2002).

S velikostí genomu pozitivně koreluje počet mikrosatelitů. Primer *et al.* (1997) zjistili, že polovina z 22 di-, tri- a tetranukleotidových repetic byla jasně četnější u člověka než u třech testovaných druhů ptáků. Ve výskytu zbývajících motivů nenalezli autoři žádný jasný rozdíl. Na základě prohledání databází dále Primer *et al.* (1997)

odhadují, že výskyt mikrosatelitů v ptačím genomu je 1 na 29 až 39 kb, zatímco v genomu člověka je to 1 na 6 až 30 kb.

Důvodem pro nízkou frekvenci mikrosatelitů v genomu ptáků mohou být odlišné SINE/LINE elementy, které u ptáků nekončí poly-A sekvencí. Poly-A sekvence je u savců zdrojem repetitivní DNA. Dále mají ptáci v genomu tzv. mikrochromozomy, na kterých je podstatně vyšší frekvence genů a tedy méně mikrosatelitů (Gregory, 2002; Primer *et al.*, 2007).

### **3.3.2.5 Izolace mikrosatelitů *de novo***

Mikrosatelity se nacházejí v nekódujících oblastech DNA, kde je frekvence mutací mnohem vyšší, než v oblastech kódujících. Z toho důvodu lze využít stejné primery pro amplifikaci mikrosatelitů pouze u velmi blízce příbuzných druhů. U evolučně vzdálenějších druhů kumulace mutací v oblastech obklopujících mikrosatelitové lokusy brání úspěšnému nasedání primerů. Proto je při studiu nového druhu často nutné izolovat mikrosatelitové lokusy a navrhnout primery *de novo* (Zane *et al.*, 2000; Zima *et al.*, 2004).

Existuje celá řada protokolů pro izolaci mikrosatelitových lokusů. Často se jedná o modifikace původní tradiční metody vycházející z genomických knihoven studovaných druhů (Zane *et al.*, 2000). Nejprve je genomická DNA fragmentována pomocí restričních endonukleáz nebo ultrazvukových vibrací. Jednotlivé fragmenty jsou rozděleny podle velikosti a pro další krok vybrány fragmenty o velikosti 300 až 700 bp. V závislosti na způsobu fragmentace jsou pak vloženy do vektoru přímo, nebo po ligaci adaptorů. Pomocí vektorů jsou transformovány kompetentní buňky. Transformace přináší tisíce rekombinantních klonů, které jsou následně testovány na přítomnost mikrosatelitových sekvencí. Screening se provádí pomocí Southern hybridizace s použitím sond, které se vážou na mikrosatelitové sekvence. Po identifikaci klonů obsahujících repeticce jsou navrženy primery a optimalizovány podmínky pro PCR amplifikaci (Zane *et al.*, 2000; Zima *et al.*, 2006).

### 3.3.2.6 *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů

Izolace mikrosatelitových lokusů *de novo* je časově i finančně náročná. Z toho důvodu je často využívána *cross-species* amplifikace. Jde o využití primerů navržených pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitových lokusů jiných druhů. Úspěšnost *cross-species* amplifikace závisí evoluční vzdálenosti mezi druhy. Polymorfní produkty poskytují obvykle pouze primery získané od blízce příbuzných druhů (Primer *et al.*, 1996).

U ptáků byla *cross-species* amplifikace poprvé testována na mikrosatelitových lokusech izolovaných od vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) a lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) a to u druhů z 23 různých čeledí (Primer *et al.*, 1996).

## 3.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je jednou z nejvýznamnějších metod molekulární biologie. Byla objevena Kary B. Mulisem v roce 1985. Umožňuje selektivní *in vitro* amplifikaci určitého specifického úseku DNA bez nutnosti předchozího klonování ve vektorech (Šmarda *et al.*, 2005). Jedinečnost této metody spočívá především v tom, že množství původní DNA může být velmi malé, teoreticky by stačila i jediná molekula. Navíc DNA nasyntetizovaná pomocí PCR obsahuje prakticky výhradně studovanou sekvenci, není tedy zpravidla nutná její další purifikace (Zima *et al.*, 2004).

Jako zdroj DNA pro PCR jsou využívány různé biologické materiály, např. extrakty z krve, tělní tekutiny, kultury mikroorganismů, buňky z tkáňových kultur, atd. (Šmarda *et al.*, 2005).

### 3.4.1 Složení PCR mixu

Podstatou PCR je cyklická enzymatická syntéza nových molekul DNA prostřednictvím enzymu DNA-polymerázy. Používají se termostabilní polymerázy izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza probíhala opakovaně formou cyklů (Šmarda *et al.*, 2005; Brown, 2007).

Kromě již zmíněné DNA-polymerázy jsou další nezbytnou složkou reakční směsi PCR dva krátké oligonukleotidy, které jsou komplementární k okrajovým částem studované sekvence. Vážou se na protilehlé řetězce 3' konci proti sobě a slouží jako primery syntézy DNA (Šmarda *et al.*, 2005, Brown, 2007). Dále je nutné dodat stavební jednotky nových řetězců DNA, a to ve formě deoxyribonukleozid trifosfátů (dNTP). Do reakce dodáváme čtyři typy dNTP: dATP, dCTP, dGTP a dTTP. Po navázání primerů začíná DNA-polymeráza přidávat k jejich 3' konci jednotlivé nukleotidy na základě komplementarity s templářovou molekulou, přičemž spotřebovává energii vázanou ve fosfátových vazbách dNTP (Zima *et al.*, 2004). Pro zdárný průběh reakce je dále nezbytná přesně stanovená koncentrace hořčičných iontů a stálé prostředí zabezpečované přidáním komerčně dodávaného reakčního pufru, jehož složení se liší podle použité polymerázy. Objem reakce bývá doplněn deionizovanou vodou (Zima *et al.*, 2004).

### 3.4.2 Průběh PCR

PCR je proces, který se skládá ze tří kroků s odlišnými teplotními podmínkami. Celý proces začíná zahřáním DNA na teplotu, při které dochází k její denaturaci. Tato teplota bývá vyšší než 90 °C, často v rozmezí 92 až 95 °C. Doba trvání první denaturace je zpravidla delší, než je tomu v ostatních cyklech, protože musí dojít k oddělení delších fragmentů. První denaturace obvykle probíhá 2 až 5 minut, v dalších cyklech postačí 15 až 45 s. Dále je teplota snížena na 45 až 60 °C. Pokud jsou v roztoku přítomny oba primery v dostatečné koncentraci, nasedají na komplementární sekvence templátové DNA (annealing). Délka tohoto kroku je obvykle 30 až 60 s. Syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy probíhá za teploty 65 až 75 °C, přičemž teplotní optimum *Taq* polymerázy je 72 °C. Délka třetího kroku je závislá na délce produktu. Pokud amplifikujeme krátké fragmenty (do 500 bp), postačí 30 s, pokud je sledovaný úsek delší, je nutné dobu prodloužit. Na konci posledního cyklu se obvykle připojuje několik minut trvající finální extenze při 72 °C, abychom zabránili výskytu neúplných fragmentů kratší délky. Celý proces se opakuje, přičemž v každém dalším cyklu primery hybridizují i s nově nasyntetizovanými molekulami (Zima *et al.*, 2004; Šmarda *et al.*, 2005).



Reakce probíhá v zařízení zvaném termocyklér, v němž se teplota mění automaticky ve stanovených časových intervalech. Teoreticky se v každém cyklu počet kopií zdvojnásobí, množství nasyntetizované DNA tedy roste exponenciálně. Reakce běží obvykle 25 – 35 cyklů, při vyšším počtu cyklů dochází ke vzniku nespecifických produktů nebo inhibici reakce produktem.

### **3.4.3 Analýza PCR produktu**

Produkty PCR jsou nejčastěji analyzovány pomocí elektroforetické separace v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Molekuly DNA jsou nabitý záporně, v elektrickém poli tedy putují od katody k anodě. Protože všechny molekuly DNA mají stejný záporný náboj, je rychlost separace závislá výhradně na velikosti separovaných fragmentů (Zima *et al.*, 2004). Vzniklé bandy lze vizualizovat pomocí radioaktivního značení, etidiumbromidu, dusičnanu stříbrného, nebo pomocí různých druhů fluorescenčních barviv (Koreth *et al.*, 1996).

### **3.4.4 Problémy při analýze PCR produktu**

#### **3.4.4.1 Nulové alely**

Nulová alela je každá alela v mikrosatelitovém lokusu, která se neamplifikuje pomocí PCR reakce. Taková alela v genetických studiích zvyšuje frekvenci homozygotů. Při paternitních studiích se její nerozpoznání může projevit falešným vyloučením otce (Jones *et Arden*, 2003; Dakin *et Avise*, 2004).

Příčinnou vzniku nulových alel bývají nejčastěji mutace v sekvencích obklopujících mikrosatelitový lokus, kde nasedají primery. Zvláště pokud se jedná o místo, kde nasedá 3' konec primeru, zabrání mutace správnému nasednutí primeru a je tím znemožněno zahájení syntézy nového řetězce DNA (Dakin *et Avise*, 2004; Chapuis *et Estoup*, 2006). Nulové alely mohou být generovány také diferenční amplifikací různě dlouhých alel. Z důvodu konkurenční povahy PCR jsou krátké alely amplifikovány efektivněji než dlouhé, takže u heterozygotního jedince může být detekována pouze kratší z obou alel. Nulové alely vznikající diferenční amplifikací jsou označovány také jako *partial null*, protože mohou být nalezeny při testování více vzorků nebo regulaci

kontrastu. Třetím zdrojem nulových alel je selhání PCR z důvodu nízké kvality nebo koncentrace templátové DNA (Dakin *et* Avise, 2004).

Někdy se podle získaných dat může zdát, že lokus obsahuje nulovou alelu, ačkoli to tak není. Příčinnou zvýšené frekvence homozygotů totiž vedle přítomnosti nulové alely může být i např. Wahlundův efekt, inbreeding, nebo lokalizace mikrosatelitového lokusu na pohlavním chromozómu. Tyto případy lze eliminovat použitím multilokusové analýzy (Dakin *et* Avise, 2004; Chapuis *et* Estoup, 2006).

#### **3.4.4.2 Stutter bandy**

Kromě originální alely se na elektroforetickém záznamu gelové i kapilární elektroforézy často objevují další bandy o nižší intenzitě zabarvení, tzv. *stutter* bandy. Jedná se o PCR produkty, které se od originální alely odlišují o celé násobky jednotky repetice (Ellegren, 2004). Nejintenzivnější *stutter* bandy jsou zpravidla tvořeny úseky DNA o jednu jednotku repetice kratší než originální alela, kratší úseky pak zpravidla mají nižší intenzitu (Koreth *et al.*, 1996).

Počet a intenzita *stutter* bandů souvisí s délkou jednotky repetice. Nejvíce *stutter* bandů lze nalézt u alel složených z dinukleotidových repetic, u tetranukleotidových repetic obvykle intenzita o čtyři nukleotidy kratšího PCR produktu nedosahuje ani 10 % intenzity originální alely (Walsh *et al.*, 1996). Mimo to množství a intenzita *stutter* bandů pozitivně koreluje s počtem jednotek opakování (Walsh *et al.*, 1996; Ellegren, 2004).

*Stutter* bandy vznikají nejčastěji sklouznutím DNA-polymerázy při *in vitro* amplifikaci DNA. Výsledkem je PCR produkt o jednu jednotku repetice kratší než templátová molekula. *Stutter* bandy delší než originální alela vznikají v důsledku přidání nukleotidu na 3' konec nové molekuly *Taq* polymerázou (Koreth *et al.*, 1996).

#### **3.4.4.3 Alelová homoplazie**

Dvě alely, které mají stejnou velikost nebo i stejnou sekvenci nemusí být nutně identické původem. Takové alely, které pocházejí z odlišné ancestrální alely, případně pocházejí ze stejné ancestrální alely, ale prošly odlišnou evoluční historií, se nazývají homoplazické (Jarne *et* Lagoda, 1996).

Alelová homoplazie může působit problémy při hodnocení příbuznosti dvou jedinců nebo skupin, protože alely se jeví jako zděděné od společného předka, ačkoli tomu tak není. Problémy vznikají zejména při analýzách prováděných na velkých populacích, u alel s velkou mutační rychlostí a silným velikostním omezením (Estoup *et al.*, 2002; Anmarkrud *et al.*, 2008). Dle Estoup *et al.* (2002) alelová homoplazie nepředstavuje v paternitních studiích velký problém, zvláště pokud nemá alela příliš velkou mutační rychlost, protože se obvykle jedná o analýzu prováděnou na příslušnicích malého počtu generací.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Genomická DNA použitá pro analýzy byla vyizolována z krve šesti nepříbuzných jedinců druhu ibis rudý (*Eudocimus ruber*) chovaných v ZOO ve Dvoře Králové nad Labem. K izolaci byla použita fenol-chloroformová metoda podle Maniatis *et al.* (1982) upravená pro materiální a technické podmínky Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty UP.

### 4.2 PCR amplifikace DNA

Genomická DNA šesti nepříbuzných jedinců ibise rudého byla amplifikována pomocí 157 párů primerů navržených pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitových lokusů dvou druhů z řádu plameňáci: plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) a deseti druhů z řádu veslonoží: fregatky malé (*Fregata minor*), kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), tereje červenonohého (*Sula sula*), tereje guánového (*Sula variegata*) a tereje modronohého (*Sula nebouxii*). Jednotlivé mikrosatelitové lokusy pro tyto druhy jsou uvedeny v tabulce č. 1.

**Tabulka č. 1:** Přehled mikrosatelitových lokusů testovaných u ibise rudého. V tabulce je dále uveden zdrojový druh, zařazení do řádu a autor publikace.

Řád	Zdrojový druh	Testované lokusy	Autor
Plameňáci ( <i>Phoenicopterus</i> <i>iformes</i> )	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopterus ruber</i> )	Pruμ 7, Pruμ 8, Pruμ 9	Kapil <i>et al.</i> , 2010
		Pruμ 13	Preston, 2005

<b>Plameňáci</b> (Phoenicopteriformes)	Plameňák růžový ( <i>Phoenicopterus roseus</i> )	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139	Geraci <i>et al.</i> , 2010
	<b>Veslonoží</b> (Pelecaniformes)	Fregatka obecná ( <i>Fregata minor</i> )	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18
	Kormorán galapážský ( <i>Phalacrocorax harrisi</i> )	PhB2, PhB4, PhB11, PhC11, PhD11, PhF12, PhG8, PhG12	Duffie <i>et al.</i> , 2008
	Kormorán chocholatý ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> )	Phaari01, Phaari02, Phaari03, Phaari04, Phaari05, Phaari06, Phaari07, Phaari08, Phaari09, Phaari11, Phaari12, Phaari13, Phaari14, Phaari15, Phaari16, Phaari17	Barlow <i>et al.</i> , 2010
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	Dcco-01, Dcco-02, Dcco-03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08	Mercer <i>et al.</i> , 2010
		COR 01, COR 03, COR 05, COR 06, COR 07, COR 12, COR 15, COR 17, COR 19, COR 20, COR 21, COR 22, COR 23, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 35, COR 38, COR 40, COR 41, COR 43, COR 45, COR 47	Fike <i>et al.</i> , 2009
	Kormorán velký ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )	PcD2, PcD4, PcD5, PcD6, PcT1, PcT3, PcT4,	Piertney <i>et al.</i> , 1998
	Pelikán bílý ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL221, PEL207, PEL265, PEL304	De Ponte Machado <i>et al.</i> , 2008
	Pelikán severoamerický ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 07, PeEr 08, PeEr 09	Hickman <i>et al.</i> , 2008
	Terej červenonohý ( <i>Sula sula</i> )	Ss1b-16, Ss1b-51, Ss1b-57, Ss1b-98, Ss1b-106, Ss1b-142, Ss2b-2, Ss2b-35, Ss2b-48, Ss2b-71, Ss2b-88, Ss2b-92, Ss2b-110, Ss2b-138, Ss2b-153	Morris-Pocock <i>et al.</i> , 2010

<b>Veslonoží</b> (Pelecaniformes)	Terej guánový ( <i>Sula variegata</i> )	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-45, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-152, Sv2B-27, Sv2B-138	Taylor <i>et al.</i> , 2010
	Terej modronohý ( <i>Sula nebouxii</i> )	Boob-RM2-F07, Boob-RM3-D07, Boob-RM3-F11, Boob-RM4-A08, Boob-RM4-B03, Boob-RM4-C03, Boob-RM4-D07, Boob-RM4-E03, Boob-RM4-E10, Boob-RM4-F11, Boob-RM4-G03	Faircloth <i>et al.</i> , 2009
		Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B-100,	Taylor <i>et al.</i> , 2010

PCR Reakční směs pro šest vzorků byla připravena napipetováním níže uvedených složek do 1,5ml mikrozkuhavky.

<b>Deionizovaná voda</b>	41,9 µl
<b>Reakční pufr</b> (50 mmol/l Tris-HCl, pH 8, 100 mmol/l NaCl, 0,1 M EDTA, 1 mmol/l DTT, 50% glycerol, 1% Triton X-100)	6,70 µl
<b>Roztok MgCl<sub>2</sub></b> o koncentraci 25 nmol/l	3,75 µl
<b>Roztok dNTPs</b> o koncentraci 20 µmol/l	0,65 µl
<b>Primer F</b> o koncentraci 10 µmol/l	3,10 µl
<b>Primer R</b> o koncentraci 10 µmol/l	3,10 µl
<b>Taq DNA-polymeráza</b> 5 U/µl	1,00 µl

Po napipetování všech složek bylo nutné mikrozkuhavku zvortexovat a krátce zcentrifugovat. Reakční směs byla poté rozpiperována do šesti 0,2ml mikrozkuhovek. Každá reakce se skládala z 9 µl PCR reakční směsi a 1 µl DNA o koncentraci přibližně 50 µg/ml. PCR probíhala v termocykléru s následujícím základním časovým a teplotním profilem.

5 min	94 °C	
30 s	94 °C	} 35 cyklů
30 s	50 °C	
30 s	72 °C	
7 min	72 °C	

Základní teplota annealingu byla 50 °C. Pro polymorfní mikrosatelitové lokusy byla teplota dále upravována. Optimální  $T_a$  pro jednotlivé lokusy je uvedena v tabulce č. 2 v kapitole Výsledky.

### 4.3 Zpracování PCR produktů

PCR produkty byly analyzovány pomocí vertikální elektroforetické separace v 6% agarózovém gelu za denaturačních podmínek. Postup byl optimalizován pro použití vyhřívané sekvenční elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 333 x 392 mm a 333 x 418 mm a tloušťkou gelu 4 mm.

Delší sklo bylo vydrhnuto kartáčkem, opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno. Plocha, která se bude dotýkat gelu, byla opláchnuta 96% ethanolem a ošetřena přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů (Clear Vue). Po zaschnutí bylo sklo dvakrát opáchnuto deionizovanou vodou a osušeno.

Kratší sklo bylo vydrhnuto saponátem, opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno. Plocha, která bude v kontaktu s gelem, byla dvakrát omyta 96% ethanolem a potřena molekulárním lepidlem. Po zaschnutí molekulárního lepidla bylo sklo čtyřikrát ořeno papírovým ručníkem navlhčeným v ethanolu.

Na delší okraje většího skla byly souběžně s hranami přiloženy 0,4 mm silné spacery a na ně bylo ošetřenou stranou dolů položeno kratší sklo. Skla byla k sobě přichycena pomocí několika klipsů.

Gel byl připraven v kádince smísením 60 ml 6% roztoku akrylamid : N,N'-metylenbisakrylamid 19 : 1 dále 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného a 40  $\mu$ l N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu a poté nalit do prostoru mezi skly.

Do gelu byl rovnou stranou dovnitř zasunut hřebínek do hloubky přibližně 0,5 cm a zafixován pomocí klipsů. Gel byl ponechán 60 minut polymerizovat.

Po zatuhnutí gelu byly odstraněny klipsy, skla byla očištěna od zbytků gelu, osušena a upevněna do elektroforetické komůrky. Katodový i anodový prostor byl zalit 0,5 TBE pufrém a byl vyjmut hřebínek. Prostor hřebínku bylo nutné očistit proudem pufru z injekční stříkačky. Komůrka byla poté připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Gel byl přehříván při 90 W (3000 V/150 mA) 30 minut.

Pět minut před nanášením do gelu byly PCR produkty smíchány s 5  $\mu$ l nanášecího pufru a vloženy na 3 minuty do denaturačních podmínek. Poté byly okamžitě přeneseny do ledové tříště, aby bylo zabráněno renaturaci denaturovaných vláken DNA.

Během denaturace byla elektroforetická komůrka odpojena od zdroje elektrického proudu. Mezera mezi skly byla znovu vyčištěna a poté do ní byl vsunut hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu.

Pomocí osmikanálové pipety byly do mezer mezi zoubky hřebínku nanесeny připravené vzorky, vždy po 2  $\mu$ l vzorku do jedné jamky. Po nanесení všech vzorků byla komůrka znovu připojena ke zdroji elektrického proudu. Výkon byl nastaven na limitní hodnotu 70 W, elektrické napětí a proud zůstaly nastavené na maximum (3000 V/150 mA). Elektroforetická separace probíhala 1,5 až 4 hodiny.

Během elektroforetického dělení vzorků byly připraveny roztoky pro vymývání gelu a následnou vizualizaci. Složení roztoků je popsáno v kapitole Použité roztoky.

Po rozdělení PCR produktů byl vypnut zdroj elektrického proudu, elektrody byly odpojeny a byl vypuštěn pufr z katodového prostoru. Skla s gelem byla vyjmuta z elektroforetické komůrky a oddělena od sebe pomocí nožiku. Kratší sklo s přilepeným gelem bylo umístěno na třepačku do misky s fix-stop roztokem. Doba působení fix-stop roztoku byla 20 minut. Poté byl fix-stop roztok slit zpět do baňky.

Sklo s gelem bylo třikrát opláchnuto deionizovanou vodou a na 5 minut vloženo do fotomisky s 1% roztokem kyseliny dusičné.

Následně byl gel čtyřikrát opláchnut deionizovanou vodou a ponořen do 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného, kde byl ponechán 30 minut. Po uplynutí této doby byl gel opláchnut vodou a umístěn do fotomisky na třepačce.



Gel byl zalit vychlazenou vývojkou. Byl sledován vývoj hnědočerných, stříbrem obarvených proužků PCR produktů.

Když byly proužky dostatečně zřetelné, bylo vyvíjení zastaveno přilítím fix-stop roztoku. Poté bylo sklo omyto deionizovanou vodou a usušeno v sušárně (60 °C/60 minut) nebo volně přes noc. Vysušené sklo bylo hodnoceno na negatoskopu a naskenováno.

Sklo s již nepotřebným gelem bylo na několik hodin ponořeno do roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l, kde došlo k odlepení gelu. Následně bylo sklo omyto a připraveno k dalšímu použití.

## 4.4 Chemikálie a roztoky

### 4.4.1 Použité chemikálie

Akrylamid	(Applichem)
<i>aTaq</i> DNA-polymeráza (5U/μl), M1241	(Promega)
Bromfenolová modř	(Serva)
dNTPs (100 mmol/l, 400 μl každého), U1240	(Promega)
Deionizovaná voda	
Dusičnan stříbrný	(Lachema)
Ethanol – 96% roztok	(Lihovar Vrbátky)
Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na <sub>2</sub> EDTA)	(Lachema)
Formaldehyd	(Lachema)
Formamid	(Lachema)
Hydroxid sodný	(Lachema)
Kyselina boritá	(Lachema)
Kyselina dusičná – 65% roztok	(Lachema)
Kyselina octová – ledová	(Lachema)
3-methakryloxypropyltrimethoxysilan	(Serva)
Močovina	(Lachema)
N,N'- methylenbisakrylamid	(Applichem)
N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED)	(Serva)
Peroxodisíran amonný	(Serva)

Clear Vue, Rain Repellent	(Turtle WAX)
Thiosíran sodný	(Lachema)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	(AppliChem)
Uhličitan sodný	(Lachema)
Xylenová modř (Xylencyanol FF)	(AppliChem)

#### **4.4.2 Použité roztoky**

##### ***Akrylamid (6% zásobní roztok)***

420 g močoviny

484 ml deionizované vody

50 ml 10 x TBE

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

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

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

800 ml deionizované vody

0,8 g dusičnanu stříbrného

- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

##### ***Fix-stop roztok***

800 ml deionizované vody

88 ml ledové kyseliny octové

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

40 g hydroxidu sodného

- doplnit deionizovanou vodou do 1 l

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

800 ml deionizované vody

12 ml 65% kyseliny dusičné

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

0,125 g bromfenolové modře

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

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

1 g peroxodisíranu amonného  
- rozpustit v 10 ml deionizované vody

***Polyakrylamidový gel (6%)***

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

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

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

***TBE pufr (zásobní roztok 10x)***

108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)  
55 g kyseliny borité H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
40 ml roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0  
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

***Vývojka***

800 ml deionizované vody  
24 g uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
- vychladit na teplotu nižší než 10 °C  
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

## **4.5 Laboratorní přístroje**

Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150

(Pharmacia)

Elektroforetický zdroj EV232

(Consort)

Chladnička kombinovaná	(Whirlpool)
Laboratorní váhy EK-200g	(AND)
Mikropipeta Finnpiette 0,5 až 10 µl (osmikanálová)	(Labsystems)
Mikropipeta Finnpiette 0,3 µl až 1 ml	(Labsystems)
Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml	(Nichiryo)
Minicentrifuga Spectrafuge Mini	(Cleaver Scientific)
Negatoskop NEGA1	(Maneko)
Sekvenační elektroforetická komůrka S2	(Whatman Biometra)
Sušárna HS 122S	(Chirana)
Temperovaný blok Dry-block DB-2D	(Labnet International)
Termocyklér Gene-Pro	(BIOER technology)
Termocyklér PTC 100-96 VHB	(MJ Research)
Termocyklér XP Thermal Cycller	(BIOER technology)
Třepačka Orbit 1 900	(Labnet International)
Vortex MS2	(Ika)
Výrobník deionizované vody typ 02	(AquaOsmotic)
Výrobník ledu Icematic F100 Compact	(Castel Mac)

## **5 Výsledky**













## **6 Diskuze**













## 7 Závěr

V této bakalářské práci jsem se zabývala hledáním nových polymorfních mikrosatelitových lokusů vhodných pro analýzu paternity u ibise rudého (*Eudocimus ruber*). Metodou *cross-species* amplifikace jsem za využití primerů navržených pro blízké příbuzné druhy z řádů plameňáci (Phoenicopteriformes) a veslonoží (Pelecaniformes) amplifikovala DNA vyizolovanou z krve šesti nepříbuzných jedinců ibise rudého pocházejících ze ZOO Dvůr Králové nad Labem.

Z celkového počtu 181 otestovaných párů primerů 21 amplifikovalo polymorfní mikrosatelitové lokusy u ibise rudého. Tyto primery byly odvozeny od fregatky obecné (*Fregata minor*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*), tereje červenonohého (*Sula sula*), tereje guánového (*Sula variegata*) a tereje modronohého (*Sula nebouxii*). Průměrný počet alel na lokus byl 2,65, průměrná heterozygotnost byla 0,47.

Tyto mikrosatelitové lokusy mohou být dále využity v paternitních studiích u ibise rudého.

## 8 Seznam použitých zkratek

A	adenin
bp	pár bazí ( <i>base pair</i> )
C	cytozin
dATP	deoxyriboadenozin trifosfát
dCTP	deoxyribocytidin trifosfát
dGTP	deoxyriboguanidin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleozid trifosfát
dTTP	deoxyribotymidin trifosfát
EPC	mimopárové kopulace ( <i>Extra-Pair Copulations</i> )
EPP	mimopárová paternita ( <i>Extra-Pair Paternity</i> )
G	guanin
H <sub>o</sub>	pozorovaná heterozygotnost ( <i>observed heterozygosity</i> )
ITR	obrácená koncová repetice ( <i>Inverted Terminal Repeat</i> )
kb	kilobaze
LINE	dlouhá rozptýlená repetice ( <i>Long Interspersed Element</i> )
Mb	mega párů bazí
MRV	variace minisatelitových repetit ( <i>Minisatellite Variant Repeat</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SINE	krátká rozptýlená repetice ( <i>Short Interspersed Element</i> )
SSR	repetice jednoduchých sekvencí ( <i>Simple Sequence Repeats</i> )
SRTs	krátké tandemové repetice ( <i>Short Tandem Repeats</i> )
T	tymin
T <sub>a</sub>	teplota annealingu
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TSD	zdvojení cílového místa ( <i>Target Site Duplication</i> )
VNTR	variabilní počet tandemových repetit ( <i>Variable Number of Tandem Repeat</i> )

## 9 Použitá literatura

- Alderton, D. (1995): Ptáci. Edice Příroda. Nakladatelský dům OP, Praha.
- Anmarkrud, J.A., Kleven, O., Bachmann, L., Lifjeld, J.T. (2008): Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evolutionary Biology* 8, 138.
- Anonymous, (2011a): *Threskiornithidae*. The IUCN Red List of Threatened Species. přístup z: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org), navštíveno dne 29. 6. 2011.
- Anonymous, (2011b): Ibis rudý. ZOO Zlín. přístup z: [www.zoozlin.eu](http://www.zoozlin.eu), navštíveno dne 29. 6. 2011.
- Anonymous, (2011c): Zařazení v systému. Biolib. přístup z: [www.biolib.cz](http://www.biolib.cz), navštíveno dne 8. 4. 2011
- Barlow, E.J., Telford, A., Cavers, S. (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Bennett, P. (2000): Demystified...microsatellites. *Molecular Pathology* 53, 177-183.
- Brown, T.A. (2007): Klonování genů a analýza DNA. Úvod. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Burnie, D. (2002): Zvíře. Obrazová encyklopedie živočichů všech kontinentů. Knižní klub, Praha.
- Burnie, D., Hoare, B., DiCostanzo, J. (2008): Ptáci, obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha.
- Buschiazzo, E., Gemmell, N.J. (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28, 1040-1050.
- Campbel, N.A., Reece J. B. (2006): Biologie. Computer Press, Brno.
- Cogger, H.G., Benda, P., Kirshner, D. (1994): Obratlovci : savci, ptáci, obojživelníci, plazi : encyklopedický průvodce světem zvířat. Ptáci. Nakladatelský dům OP, Praha.
- Dakin, E.E., Avise, J.C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504-509.
- De Ponte Machado, M., Feldheim, K.A., Sellas, A.B., Bowie, R.C.K. (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus nocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation genetics* 10, 1033-1036.
- Dearborn, D.C., Hailer F., Fleischer R.C. (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* 8, 1399-1401.

- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. (1992): Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.
- Duffie, C., Glenn, T. C., Hagen, C., Parker, P. (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources* 8, 625-627.
- Ellegren, H. (2004): Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Genetics* 5, 435-445.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J-M. (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.
- Faircloth, B.C., Ramos, A., Drummond, H., Gowaty, P.A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *Conservation Genetics Resources* 1, 159-162.
- Fike, J.A., Devault, T.L., Rhodes, O.E. (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* 9, 1183-1185.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): Zoologie obratlovců, 2. přepracované vydání. Academia, Praha.
- Geraci, J., Gaillard, M., Bechet, A., Cezilly, F., Wattier, R.A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Gill, F., Wright, M. (2006): Birds of the World: Recommended English Names. Princeton University Press, published online.
- Gosler, A. (1994): Atlas ptáků světa. Příroda, Bratislava.
- Gregory, T.R. (2002): A bird's-eye view of the c-value enigma: genome size, cell size, and metabolite rate in the class aves. *Evolution* 56, 121-130.
- Griffith, S.C., Owens, I.P.F., Thuman, K.A. (2002): Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* 11, 2195-2212.
- Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C., Yuri, T. (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763-1768.
- Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C., Yuri, T. (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763-1768.

- Hanzák, J., Hudec, K. (1974): Světem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci. Albatros, Praha.
- Hedges, S.B., Sibley C.G. (1994): Molecules vs. morphology in avian evolution: The case of the "pelecaniform" birds. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 9861-9865
- Hickman, C.R., Peters M.B., Crawford N.G., Hagen C., Glenn T.C., Somers C.M. (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* 8, 1439-1441.
- Horáková, I. (2010): Analýza polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u ibise hagedaše (*Bostrychia hagedash*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Chambers, G.K., MacAvoy, E.S. (2000): Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 126, 455-476.
- Chapuis, M.-P., Estoup, A. (2007): Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621-631.
- Churý, J., Crha, J., Fraňo, J. (1966): Biologie se základy zoologie. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 424-429.
- Jones, A.G., Arden, W.R. (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12, 2511-2523.
- Kapil, R., Sawyer, G.M., Preston, L., Benjamin, R.C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamenco (*Phoenicopterus ruber ruber*). Preprint.
- Koreth, J., O'Leary, J.J., McGee, J.O'D. (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis. *The Journal of Pathology* 178, 239-248.
- Mercer, D.M., Haig, S.M., Mullins, T.D. (2010): Isolation of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources*, published online.
- Morris-Pocock, J.A., Taylor, S.A., Sun, Z., Friesen, V.L. (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Petrie, M., Kempnaers, B. (1998): Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. *Trends in Ecology and Evolution* 13, 52-58.
- Piertney, S. B., Goostrey A., Dallas, J. F., Carss, D. N. (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology* 7, 138-140.

- 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, C.R., Møller, A.P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of *cross-species* microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5, 365-378.
- Primmer, C.R., Painter, J.N., Koskinen, M.T., Palo, J.U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36, 348-360.
- Primmer, C.R., Raudsepp, T., Chowdhary, B.P., Møller, A.P., Ellegren, H. (1997): Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research* 7, 471-482 .
- Ramel, C. (1997): Mini- and microsatellites. *Environmental Health Perspectives* 105, 781-789.
- Ramel, G. (1999): The Ciconiiformes. přístup z: [www.earthlife.net](http://www.earthlife.net), navštíveno dne 29. 6. 2011
- Santos, M.S., Gonçalves, E.C., Barbosa, M.S.R., Silva, S., Schneider, M.P.C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae-Aves). *Molecular Ecology Notes* 6, 307-309.
- Šeda, O., Liška, F., Šedová, L. (2006): Aktuální genetik. přístup z: <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/index.htm>, navštíveno dne 3. 4. 2011
- 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, S.A., Morris-Pocock, J.A., Sun, Z., Friesen, V.L. (2009): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151, 525-528.
- Vergnaud, G., Denoeud F. (2000): Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome research* 10, 899-907
- Veselovský, Z. (2001): Obecná ornitologie. Academia, Praha.
- Vrbatová, J. (2009): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u ibise rudého (*Eudocimus ruber*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Vrbatová, J. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u ibise rudého (*Eudocimus ruber*). Diplomová práce. (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

- Walsh, S.P., Fildes, N.J., Reynolds, R. (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acid Research* 24, 2807-2812.
- Westneat, F., Stewart, R.K. (2003): Extra-pair paternity in birds: causes, correlates, and conflict. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34, 365-96
- Zane, L., Bargelloni, L., Paternello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.
- Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, J. (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.