

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Lucie Hyráková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza polymorfních *cross-species*
mikrosatelitů pro determinaci paternity
u volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*)**

Bakalářská práce

Lucie Hyráková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

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 6. 5. 2010

Lucie Hyráková

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

Práce vznikla za finanční podpory Vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (IGA UPOL) v rámci projektu PrF_2010_052 „Mezidruhová amplifikace polymorfních DNA mikrosatelitů u vodních ptáků“.

SOUHRN

Mikrosatelity jsou vysoce proměnlivé opakující se sekvence DNA, které se v genomu vyskytují ve velkém množství. Tím se stávají vhodnými genetickými markery pro určování genetických vztahů mezi jedinci, zvláště pak pro určování paternity. Metoda amplifikace mikrosatelitové DNA pomocí *cross-species* primerů příbuzných taxonů je obzvláště užitečná pro hledání mikrosatelitových lokusů u druhů, u nichž nebyly dosud tyto mikrosatelity nalezeny.

U volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*) nebyly dosud nalezeny vhodné polymorfní mikrosatelitové markery. Metodou *cross-species* amplifikace jsem na DNA volavky rusohlavé testovala primery odvozené z DNA zástupců řádů brodiví (Ciconiiformes), veslonoží (Pelecaniformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), potáplice (Gaviiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes), vrubozobí (Anseriformes), tučňáci (Sphenisciformes), a jednoho druhu z řádu sudokopytníci (Artiodactyla).

Nalezla jsem celkem 41 polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených z DNA čápa bílého (*Ciconia ciconia*), ibise japonského (*Nipponia nippon*), ibise rudého (*Eudocimus ruber*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), nesyta lesního (*Mycteria americana*), volavky velké (*Adrea herodias*), volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*), fregatky obecné (*Fregata minor*), kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), tereje modronohého (*Sula nebouxii*), plameňáka růžového (*Phoenicopus roseus*) a potáplice lední (*Gavia immer*). Tyto mikrosatelity budou dále použity pro studium paternity u volavky rusohlavé.

SUMMARY

Microsatellites are highly variable repetitive sequences of DNA, which occur in genome in a large amount. Thus become suitable genetic markers for determination of genetic relationships between individuals, especially for determination of paternity. A method of amplification microsatellite DNA by *cross-species* primers of related taxa is highly useful for searching a microsatellite loci on species, in which these microsatellites were not find yet.

In a Cattle-egret (*Bubulcus ibis*) were not found suitable polymorphic microsatellite markers yet. I tested in a Cattle-egret by cross-species amplification primers derived from DNA of taxa of Ciconiiformes, Pelecaniformes, Phoenicopteriformes, Podicipediformes, Gaviiformes, Charadriiformes, Anseriformes, Sphenisciformes and one species of Artiodactyla.

I found 42 polymorphic microsatellite loci derived from DNA of the White stork (*Ciconia ciconia*), the Crested ibis (*Nipponia nippon*), the Scarlet ibis (*Eudocimus ruber*), the Black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*), the Wood stork (*Mycteria americana*), the Great blue heron (*Ardea herodias*), the Chinese egret (*Egretta eulophotes*), the Great frigatebirds (*Fregata minor*), the Flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*), the Double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*), the Blue-footed booby (*Sula nebouxii*), the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*) and the Common loon (*Gavia immer*). These microsatellites will be use for a study of pathernity in a Cattle-egret.

OBSAH

1	<u>Úvod</u>	8
2	<u>Cíle práce</u>	9
3	<u>Současný stav řešené problematiky</u>	10
3.1	<u>Charakteristika řádu brodiví (Ciconiiformes)</u>	10
3.2	<u>Čeleď čápovití (Ciconiidae)</u>	10
3.3	<u>Čeleď ibisovití (Threskiornithidae)</u>	11
3.4	<u>Čeleď kladivoušovití (Scopidae)</u>	11
3.5	<u>Čeleď člunozobcovití (Balaenicipitidae)</u>	11
3.6	<u>Čeleď volavkovití (Ardeidae)</u>	11
	3.6.1 Volavka rusohlavá (<i>Bubulcus ibis</i>)	12
	3.6.1.1 Zařazení do systému	13
3.7	<u>Karyotyp ptáků</u>	14
	3.7.1 Karyotyp volavky rusohlavé (<i>Bubulcus ibis</i>)	15
3.8	<u>Repetitivní DNA</u>	15
	3.8.1 Tandemově repetitivní DNA	15
	3.8.2 Rozptýlená repetitivní DNA	15
3.9	<u>Partnerské vztahy u ptáků</u>	16
	3.9.1 Monogamie	16
	3.9.2 Polygamie	17
	3.9.3 Promiskuita	17
3.10	<u>Způsoby hledání nových mikrosatelitů</u>	17
	3.10.1 Princip metody PCR	18
	3.10.2 <i>Cross-species</i> PCR mikrosatelitová amplifikace u ptáků	18
	3.10.3 <i>Cross-species</i> mikrosatelity u brodivých (Ciconiiformes)	19
	3.10.4 Hledání mikrosatelitů u brodivých <i>de novo</i>	19
4	<u>Materiál a metody</u>	21
4.1	<u>Izolace genomické DNA pro PCR z krve ptáků</u>	21
4.2	<u>Testování vhodných mikrosatelitových markerů pro volavku rusohlavou analýzou cross-species mikrosatelitové DNA</u>	21
4.3	<u>PCR amplifikace DNA</u>	22
4.4	<u>Zpracování PCR produktů</u>	26
4.5	<u>Použité chemikálie</u>	28
4.6	<u>Použité roztoky</u>	29
4.7	<u>Použité laboratorní přístroje</u>	31
5	<u>Výsledky</u>	32
6	<u>Diskuse</u>	48
7	<u>Závěr</u>	53
8	<u>Seznam zkratk</u>	54
9	<u>Použitá literatura</u>	55

1 ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá analýzou polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*).

Mikrosatelity jsou sekvence DNA tvořené tandemovými repeticemi, které jsou díky své variabilitě vhodnými genetickými markery pro určování příbuzenských vztahů.

DNA vyizolovaná z krve nepříbuzných jedinců volavky rusohlavé bude pomocí metody PCR amplifikována s *cross-species* primery příbuzných taxonů, produkty amplifikace budou následně vizualizovány elektroforézou v 6% polyakrylamidovém gelu a mikrosatelity klasifikované jako polymorfní bude možné použít pro determinaci paternity.

Pro hledání polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u volavky rusohlavé budou použity primery odvozené z DNA zástupců řádů brodiví (Ciconiiformes), veslonoží (Pelecaniformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), potáplice (Gaviiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes), vrubozobí (Anseriformes), tučňáci (Sphenisciformes), a jednoho druhu z řádu sudokopytníci (Artiodactyla).

2 CÍLE PRÁCE

1. Shromáždit dostupnou literaturu.
2. Vypracovat rešerši na téma bakalářské práce.
3. Na DNA šesti nepříbuzných jedinců volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*) otestovat polymorfismus DNA mikrosatelitů, které jsou známé od druhů ptáků z řádu brodivých (Ciconiiformes), veslonohých (Pelecaniformes), plameňáků (Phoenicopteriformes) a dalších příbuzných.
4. U mikrosatelitů, které se u volavky rusohlavé projeví jako polymorfní, zoptimalizovat teplotu annealingu PCR reakce a čas separace PCR produktu v denaturujícím polyakrylamidovém gelu.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Charakteristika řádu brodiví (Ciconiiformes)

Do řádu brodiví patří středně velcí až velcí ptáci poměrně jednotného vzhledu, z nichž většina má dlouhé nohy, krk a zobák (Bejček *et* Šťastný, 1999). Nohy mají brodivé s dobře vytvořeným a nízko nasazeným palcem, vole obvykle chybí, žaludek je třídlílný. Výborně létají, hlavně plachtí při využití proudů vznikajících oteplováním vzduchu nad pevninou (Gaisler *et* Zima, 2007). Všichni zástupci jsou masožraví a jsou orientováni většinou na vodní živočichy od hmyzu po ryby a jiné obratlovce (Bejček *et* Šťastný, 1999), výjimečně jsou mrchožraví (Gaisler *et* Zima, 2007).

Hnízda stavějí obvykle na stromech nebo v rákosinách, jednotlivě nebo v koloniích, stavbě hnízda věnují velkou pozornost. Mláďata jsou nidikolní a starají se o ně oba rodiče.

Mláďata se líhnou na nízkém stupni zárodečného vývoje a nejsou schopná samostatného života. Jsou neopeřená nebo jen zčásti opeřená, mají nadměrně vyvinutou trávicí soustavu, smyslové orgány a orgány pohybu, jejich termoregulace dosud není účinná, dlouho setrvávají v hnízdě. Rodiče je zahřívají a krmí – jsou to ptáci krmiví. Mají nižší počet relativně menších vajec, zárodečný vývoj je kratší (Gaisler *et* Zima, 2007).

Zástupci řádu brodivých obývají nejrůznější typy prostředí celého světa kromě oblastí, nacházejících se blízko obou pólů. Mnoho druhů je sociálních. Většina druhů je tažných (Lowe, 1994).

Doposud bylo popsáno 113 žijících druhů z 5 čeledí: volavkovití, kladivoušovití, čápoovití, člunozobcovití a ibisovití (Bejček *et* Šťastný, 1999).

3.2 Čeleď čápoovití (Ciconiidae)

Čápoovití jsou velcí ptáci, kteří za aktivního letu či plachtění natahují svůj dlouhý krk daleko dopředu. Většina z 19 druhů je rozšířena v tropických oblastech. Hnízdí jednotlivě i v koloniích (Bejček *et* Šťastný, 1999).

3.3 Čeleď ibisovití (Threskiornithidae)

Ibisovití jsou středně velcí až velcí, koloniálně hnízdící ptáci, kteří obývají všechny světadíly s výjimkou Antarktidy. Radíme sem 32 druhů, z nichž většina je rozšířena v tropických oblastech. Osídlili především různé typy mokřadů. Jejich zobák je buď dlouhý a srpovitě zahnutý (ibisové), nebo dlouhý, rovný, vpředu zploštělý a lžícovitě rozšířený (kolpíci) (Bejček *et* Šťastný, 1999).

3.4 Čeleď kladivoušovití (Scopidae)

Do této čeledi je řazen pouze jediný druh kladivouš africký (*Scopus umbretta*), což je středně veliký pták volavkovitého vzhledu s hlavou ve tvaru kovadliny. Vyskytuje se jednotlivě nebo v párech, někdy v malých volných hejnech, potravu shání v mělké vodě. Masivní hnízdo si staví na stromech nebo na skalních stěnách. Obývá především Afriku, ale také jihozápadní Arábii. Je běžný kolem pomalu tekoucích vnitrozemských vod u ústí řek, kolonizuje sezónní vody (Lewis, 1991).

3.5 Čeleď člunozobcovití (Balaenicipitidae)

K čeledi člunozobcovití je řazen rovněž pouze jeden druh, a to člunozobec africký (*Balaeniceps rex*), nápadně velký tmavě šedý čáповitý pták s mohutným zobákem. Krk má v letu esovitě zahnut, může plachtit ve velkých výškách. Vyskytuje se jednotlivě nebo v párech, velmi zřídka v malých volných skupinách. Je plachý, často se zdržuje v husté vegetaci. Vyskytuje se hlavně ve střední Africe. Je stálý, zřejmě se přesunuje ve velmi úzkém areálu (Lewis, 1991).

3.6 Čeleď volavkovití (Ardeidae)

K volavkovitým je řazeno 60 druhů, které osídlují téměř celý svět (Bejček *et* Šťastný, 1999).

Obývají především vnitrozemské vody (Hanzák *et* Hudec, 1974). Potravu loví na mělčinách i na souši buď trpělivým vyčkáváním na místě, nebo pomalým kráčením,

přičemž mají dozadu prohnutý krk a dopředu směřující ostrý zobák. Jakmile se objeví vhodná kořist, prudce vymrští krk a zobákem ji okamžitě zasáhnou. Menší druhy se živí hmyzem, korýši, larvami obojživelníků či malými rybkami, velké druhy pak loví ryby, dospělé obojživelníky, hady, drobné savce a ptáky (Bejček *et* Šťastný, 1999).

Dlouhý krk natahují volavkovití zřídka; jen v nebezpečí nebo při jištění, když pták zjišťuje, co se v okolí děje. I při letu mají krk esovitě složen (Hanzák *et* Hudec, 1974).

Volavkovití si stavějí hnízda na stromech, v křovinách nebo v porostech vodního rostlinstva, obvykle v koloniích. Někdy hnízdí i více druhů pohromadě. V násadě bývá 3 až 6 vajec; menší druhy snášejí 7 až 8 vajec.

Mláďata setrvávají v hnízdech dlouho. Rodiče jim přinášenu potravu zprvu vyvrhují přímo do zobáků. Později vyvrhují rodiče potravu přímo na hnízdo, kde ji mláďata sama sbírají (Hanzák *et* Hudec, 1974).

Volavky jsou jednou ze skupin ptáků, pro kterou je charakteristický výskyt speciálního typu peří, tzv. prachového pudru. Toto peří nikdy nepelichá, jeho špičky se však neustále odírají, zatímco pera od báze neustále přírůstají. Odíráním špiček vzniká jemný pudrovitý prášek, který slouží k odmašťování peří (Lowe, 1994).

V rámci čeledi Ardeidae (volavkovití) se rozlišují tři hlavní typy: pravé volavky, dále kvakoši, kteří jsou aktivní hlavně v noci, a bukači, skrytě žijící ptáci, výrazněji se projevující pouze zvláštním charakteristickým bučivým hlasem (Lowe, 1994).

3.6.1 Volavka rusohlavá (*Bubulcus ibis*)

Volavka rusohlavá je malá vzrůstem (52 cm) s krátkým krkem (Lewis, 1991). Oproti jiným volavkám je zavalitější a má kratší zobák (Bejček *et* Šťastný, 1999).

V rámci druhu *Bubulcus ibis* je možné rozlišit tři poddruhy, a to *Bubulcus ibis ibis*, vyskytující se v pásu od Španělska po Írán, v severní a centrální Africe, na východě Severní Ameriky, ve střední a severní části Jižní Ameriky; dále *B. i. coromandus*, vyskytující se od Indie po jižní Japonsko a na Filipínách; a *B. i. seychellarum* obývající Seychelly (Howard *et* Moore, 1994).

Nehnízdící dospělci (po většinu roku) jsou bílí se žlutavým zobákem a nohama, hnízdící jedinci mají zobák a nohy oranžovější, temeno, hřbet a hrud' žlutooranžové (Obr. 1). Mláďata jsou bílá s černým zobákem, nohama a chodidly (Lewis, 1991). Poddruh

B. i. coromandus je větší, má rezavou celou hlavu a krk a zároveň má silnější zobák a delší nohy (Bejček *et* Šťastný, 1999).

Obvykle se neozývá, příležitostně vydává skřehotavé zvuky. Vyskytuje se v malých hejnech, často dovolí přiblížení. Některé populace jsou stálé, ostatní pravidelně migrují v rámci Afriky (Lewis, 1991).

Volavka rusohlavá se specializovala na chytání hmyzu vyplašeného velkými savci při pastvě. Původně byli těmito zvířaty zřejmě sloni a divocí kopytníci, jako je buvol, nosorožec, hroch a žirafa, ale dnes je úspěšně nahradila domácí zvířata, hlavně koně a dobytek. Tyto volavky si časem zvykly chodit za orajícím pluhem a vybírat hmyz z rozoraných brázd a díky tomuto zvyku následovaly člověka téměř do všech oblastí světa (Lowe, 1994).

Volavka rusohlavá hnízdí v koloniích, často s příbuznými druhy, v rákosí, na křovinách a na stromech nad vodou i nad suchou zemí (Hanzák *et* Hudec, 1974).

3.6.1.1 Zařazení do systému

Říše:	Živočichové (Animalia)
Kmen:	Strunatci (Chordata)
Podkmen:	Obratlovci (Vertebrata)
Nadtřída:	Čtyřnožci (Tetrapoda)
Třída:	Ptáci (Aves)
Podtřída:	Praví ptáci (Ornithurae)
Nadřád:	Letci (Neognathae)
Řád:	Brodiví (Ciconiiformes)
Čeleď:	Volavkovití (Ardeidae)
Rod:	Volavka (<i>Bubulcus</i>)
Druh:	Volavka rusohlavá (<i>Bubulcus ibis</i>)

(<http://www.biolib.cz/cz/taxonposition>)



Obr. 1: Volavka rusohlavá (*Bubulcus ibis*), foto <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage>

3.7 Karyotyp ptáků

Genom ptáků je poměrně malý a obsahuje jen málo repetitivní DNA, přibližně 15 – 20 % (Gaisler et Zima, 2007).

Chromozomy ptáků jsou velikostně diferencovány do dvou skupin. Větší páry standardní sady jsou makrochromozomy (délka 3 – 6 μm), zbývající páry o velmi malé velikosti (0,5 – 2,5 μm) se nazývají mikrochromozomy, které se nevyskytují jen výjimečně. Mikrochromozomy se chovají stejně jako jiné chromozomy, mají funkční centromery a telomery a jsou stabilní v mitotickém a meiotickém dělení. Hustota genů v mikrochromozomech ptáků je výrazně vyšší než v makrochromozomech. Mikrochromozomy tak obsahují více než polovinu genů, přestože jejich relativní délka zahrnuje pouze 18 – 23 % genomu ptáků (Gaisler et Zima, 2007).

Úroveň rekombinace, měřená četností crossing-overu, je na mikrochromozomech několikrát vyšší než na makrochromozomech. Srovnávací mapování genů ukázalo, že mnoho mikrochromozomů představuje ancestrální syntetické skupiny genů (Gaisler et Zima, 2007).

3.7.1 Karyotyp volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*)

Karyotyp volavky rusohlavé se skládá z šesti párů makrochromozómů, 23 párů mikrochromozómů a páru gonozómů. Chromozóm Z je velikostně srovnatelný s páry autozómů 3 a 4, od kterých je obtížné ho odlišit, W chromozóm je nerozeznatelný od větších mikrochromozómů (Misra *et* Srivastava, 1976).

3.8 Repetitivní DNA

V genomech eukaryotických organismů se kromě kódující DNA objevují i úseky, které nekódují protein ani RNA. Většina těchto nekódujících úseků je tvořena repetitivní DNA, nukleotidovými sekvencemi, které jsou v genomu přítomny v mnoha kopiích, ale většinou se nevyskytují uvnitř genů (Campbel *et* Reece, 2006).

3.8.1 Tandemově repetitivní DNA

Tandemově repetitivní neboli satelitní DNA tvoří krátké sekvence opakované v sériích. Je klasifikována do 3 typů v závislosti na celkové délce DNA. Běžná satelitní DNA se vyskytuje v rozpětí přes 100 tisíc párů bází, zatímco minisatelitní a mikrosatelitní subkategorie byly vytvořeny pro sekvence, které se objevují v kratších úsecích. Opakující se jednotky v jednom místě jsou většinou stejné, délka každé opakované jednotky je 1 až 10 párů bází. Celková délka opakující se DNA jednoho místa je u minisatelitů 100 až sto tisíc párů bází, u mikrosatelitů deset až sto párů bází. Mnoho z běžné satelitní DNA genomu je umístěno na chromozomových telomerách nebo centromerách, což naznačuje, že tato DNA hraje pro chromozomy zásadní úlohu.

Opakující se sekvence mikrosatelitů jsou vysoce proměnlivé v délce repeticce a liší se od jedince k jedinci. Tím se stávají vhodnými genetickými markery například pro určování paternity nebo pro soudní účely (Campbel *et* Reece, 2006).

3.8.2 Rozptýlená repetitivní DNA

Opakované jednotky tohoto typu jsou si velmi podobné, ale většinou ne vzájemně

identické; nevyskytují se jedna za druhou, ale jsou roztroušeny po genomu. Jeden úsek je obvykle dlouhý 100 až sto tisíc párů bází a opakuje se v genomu deset krát až milion krát. Většina takových sekvencí jsou transpozony, úseky DNA, které se mohou uvnitř genomu pohybovat z jednoho umístění do jiného. Jestliže se transpozon dostane doprostřed kódující sekvence jiného genu, zabraňuje normální funkci narušeného genu. Mnoho z těchto transpozonů jsou retrotranspozony, přemísťující se elementy, které se pohybují v genomu prostřednictvím RNA meziprojektu, transkriptu retrotranspozonové DNA. Pro vložení na jiné místo musí RNA transpozon opět přejít do formy DNA, což je provedeno enzymem reverzní transkriptázou, která je kódována v samotném retrotranspozonu spolu s enzymem, jenž katalyzuje začlenění na nové místo (Campbel *et* Reece, 2006).

3.9 Partnerské vztahy u ptáků

Ptačí partnerské vztahy jsou velmi variabilní jak svou délkou trvání, tak i typem svazku. Rozeznáváme tyto typy partnerských vztahů: monogamii, polygamii a promiskuitu; polygamie se dále dělí na podtypy. Některé druhy ptáků mohou mít i několik typů svazků, jako je monogamie, polygynie, polyandrie či promiskuita. Za tuto variabilitu partnerských vztahů odpovídají různé ekologické podmínky, délka hnízdní doby a potravní nabídka.

3.9.1 Monogamie

Tento typ představuje svazek jediného samce a samice, který je typický pro více než 90 % ptačích druhů. Péče o mláďata spojená se získáváním dostatečného množství potravy představuje vysoké energetické náklady, které mohou výhodněji nést oba rodiče. Soužití obou partnerů je předpokladem pro jejich dokonalou synchronizaci a vzájemné poznání, které účinně brání mezidruhovému křížení. Monogamie zajišťuje i lepší tělesnou zdatnost obou partnerů. Uzavřené páry mohou vytrvat i celý život.

3.9.2 Polygamie

Polygamie představuje svazek složený buď z více samců, nebo z více samic. Zhruba jen 3 % ptačích druhů jsou polygamická. Podle vzájemného poměru obou pohlaví se tento typ dále dělí na polygynii, polyandrii a polygynandrii.

Při polygynii se jedná o páření samce se dvěma i více samicemi. Rozeznáváme polygynii harémového typu, při které je samec současně spáren s několika samicemi, a polygynii sukcesivní, při které se samec páří postupně s několika samicemi. Jeden samec obhájí obvykle velké teritorium, na kterém hnízdí několik jeho samic. V celé ptačí říši jsou jen 2 % polygynických druhů.

Polyandrie představuje svazek, v němž se samice páří se dvěma nebo i více samci. Samice se mohou spářit současně s několika samci nebo s nimi uzavírají tyto svazky postupně. Samice u většiny polyandrických druhů jsou zdatnější, pestřeji zbarvené než samci a hrají i vůdčí roli při obhajobě teritoria. Polyandrických je necelé procento ptáků.

Polygynandrie neboli kooperativní polyandrie představuje svazek několika samců a samic, kteří se vzájemně páří a vytvářejí skupinu, jež se společně stará o potomstvo.

3.9.3 Promiskuita

Jedná se o volný a velmi krátký sexuální vztah, kdy se samec bez individuálního svazku páří s kteroukoliv příchozí samicí fyziologicky připravenou k páření. Samice samostatně přejímají péči o potomstvo. K promiskuitním ptákům patří většina ptáků s arénovým typem toku. Tokající samci se kromě předání svých genů o výchovu a další osud potomstva vůbec nestarají a ani neobhájují okrsky s důležitou potravní nabídkou (Veselovský, 2001).

3.10 Způsoby hledání nových mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou u druhů, u kterých dosud nebyly objeveny, navrhovány *de novo* nebo jsou hledány pomocí *cross-species* PCR mikrosatelitové amplifikace.

3.10.1 Princip metody PCR

Metoda je založena na amplifikaci DNA segmentů za použití DNA polymerázy a oligonukleotidových primerů, které jsou hybridizovány se stejnou sekvencí opačných vláken, které mají být amplifikovány.

Při PCR reakci probíhají tři hlavní kroky, přičemž množství amplifikovaných produktů je omezeno teoreticky pouze počtem opakování těchto kroků.

1. V prvním kroku je DNA denaturována na jednotlivá vlákna (Klug *et* Cummings, 1997).
2. Směs je ochlazená na 50 – 60°C. Při této teplotě se primery přítomné v nadměrném množství rychle připojují na specifická místa molekuly DNA (Brown, 2007).
3. Teplota je zvýšena na 72°C. Tato teplota je optimální pro aktivitu enzymu *Taq* DNA polymerázy, který se připojuje se k 3' konci každého primeru a syntetizuje nová vlákna DNA, komplementární k templátovým molekulám DNA.
4. Teplota je zvýšena na 94°C. Molekuly dvouvláknové DNA, z nichž každá obsahuje vždy jedno vlákno původní molekuly a jedno nové vlákno DNA, denaturují na jednotlivá vlákna a začíná druhé kolo cyklu (Brown, 2007).

3.10.2 *Cross-species* PCR mikrosatelitová amplifikace u ptáků

Cross-species amplifikace byla u ptáků poprvé použita při testování primerů odvozených z DNA vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) a lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) na 48 druzích ptáků různých taxonů. Mezi těmito dvěma druhy a druhy, na kterých byly provedeny testy, byl podstatný rozdíl v evoluční vzdálenosti. Vztah mezi evoluční vzdáleností a úspěšnou amplifikací daného mikrosatelitu byl shodný s údaji získanými u některých druhů savců. Poměr polymorfních mikrosatelitů mezi amplifikovanými markery klesal s rostoucí genetickou vzdáleností, což naznačuje, že kratší repetice jsou během evoluce zachovány. Proto je mikrosatelitová *cross-species* amplifikace velmi užitečná ve fylogenetických studiích i pro identifikaci druhů (Primmer *et al.*, 1996).

3.10.3 *Cross-species* mikrosatelity u brodivých (Ciconiiformes)

Metoda *cross-species* amplifikace byla u brodivých poprvé použita u ibise japonského (*Nipponia nippon*) a kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*).

Lei *et al.* (2005) zkoušeli na genomu ibise japonského amplifikaci 22 párů primerů odvozených z DNA kura bankivského (*Gallus gallus*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a pratura indického (*Bos indicus*). Polymorfismus byl prokázán u dvou ze 4 mikrosatelitů odvozených z DNA kapra obecného a u dvou mikrosatelitů odvozených z DNA pratura indického.

Chang *et al.* (2005) testovali na 67 jedincích kvakoše nočního 8 mikrosatelitových lokusů odvozených z DNA volavky velké (*Ardea herodias*). U všech osmi lokusů byl zjištěn polymorfismus, počet alel se pohyboval v rozmezí 2 až 18.

Množství *cross-species* mikrosatelitů, které by bylo možné použít pro zástupce řádu brodivých, však nebylo dostačující, proto bylo nutné přejít k navrhování primerů *de novo*.

3.10.4 Hledání mikrosatelitů u brodivých *de novo*

McGuire *et Noor* (2002) izolovali z DNA volavky velké (*Ardea herodias*) 60 mikrosatelitů. Pro 17 lokusů navrhli primery, které testovali na třech příbuzných druzích, a to na volavce bílé (*Ardea alba*), volavce popelavé (*A. cinerea*) a volavce jihoamerické (*A. cocoi*). Nalezli 15 polymorfních lokusů, které obsahovaly 2 až 18 alel.

Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) navrhli primery pro 11 polymorfních mikrosatelitů odvozených z genomu nesyta lesního (*Mycteria americana*).

Ji *et al.* (2004) z genomu ibise japonského izolovali 13 mikrosatelitových sekvencí, pro tyto sekvence navrhli primery a otestovali. Nalezli osm polymorfních mikrosatelitů, použitelných pro další studie zástupců řádu brodivých.

He *et al.* (2006) našli v genomu ibise japonského dalších 11 polymorfních mikrosatelitů obsahujících 2 až 5 alel.

Santos *et al.* (2006) izolovali z genomu ibise rudého (*Eudocimus ruber*) 10 mikrosatelitových lokusů, pro které navrhli primery. Testováním těchto mikrosatelitů na 45 jedincích ibise rudého zjistili, že všechny tyto lokusy jsou polymorfní a obsahují 3 až 17 alel.

Sawyer *et Benjamin* (2006) izolovali 6 mikrosatelitových lokusů z DNA kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*) a tyto mikrosatelity testovali na 61 jedincích. Všechny šest mikrosatelitů bylo polymorfních a obsahovaly dvě až devět alel.

Pro čápa bílého (*Ciconia ciconia*) bylo testováním 30 jedinců nalezeno 7 polymorfních mikrosatelitů obsahujících 2 až 10 alel (Shephard *et al.*, 2009). Na genomu čápa bílého byla ale také testována amplifikace 6 párů primerů odvozených z DNA nesyta lesního (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003), které se u čápa bílého projeví jako polymorfní a obsahovaly 2 až 3 alely.

Chang *et al.* (2009) našli 11 polymorfních mikrosatelitů odvozených z genomu kvakoše nočního, obsahujících 4 až 13 alel, a tyto polymorfní lokusy testovali na dalších příbuzných druzích volavek a bukačů. Autoři zde uvádějí vesměs úspěšnou amplifikaci, ale chybí zde údaje o polymorfismu.

Pro volavku žlutozobou (*Egretta eulophotes*) bylo testováním 20 jedinců nalezeno 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů obsahujících 2 až 9 alel (Huang *et al.*, 2009). Tyto polymorfní mikrosatelity byly testovány na dalších pěti příbuzných druzích volavek. Zde autoři hodnotí amplifikaci jako úspěšnou, ale rovněž chybí údaje o polymorfismu.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Izolace genomické DNA pro PCR z krve ptáků

Postup byl převzat podle Maniatis *et al.* (1982) a upraven pro materiální a technické podmínky laboratoře.

1) K 0,5 ml roztoku krve v Queen's pufru v mikroskopické kádince byl přidán roztok proteinázy K, roztok SDS a směs byla inkubována v termostatu přes noc. Poté byl ke směsi přidán fenol a chloroform.

2) Po centrifugaci byla odebrána vrchní fáze, ke které byl přidán chloroform, po další centrifugaci byla odebrána vrchní fáze. K tomuto roztoku byl přidán octan sodný a mikroskopická kádinka byla vyplněna ethanolem. Směs byla uložena do -20°C.

3) Ethanol byl odlit a sraženina DNA v mikroskopické kádince byla vysušena. K vysušené DNA byl přidán TE pufr. Směs se rozpouštěla přes noc v termostatu.

4) Po stanovení koncentrace byl roztok DNA v mikroskopické kádince zamražen v -20°C pro opětovné použití.

4.2 Testování vhodných mikrosatelitových markerů pro volavku rusohlavou analýzou *cross-species* mikrosatelitové DNA

Na vyzolované DNA šesti nepříbuzných jedinců volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*) byla testována PCR amplifikace s primery amplifikujícími polymorfní mikrosatelitové lokusy odvozenými z DNA druhů ptáků z řádů brodiví (Ciconiiformes), veslonoží (Pelecaniformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), potáplice (Gaviiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes), vrubozobí (Anseriformes), tučňáci (Sphenisciformes), a jednoho druhu z řádu sudokopytníci (Artiodactyla) (viz Tab. 1).

4.3 PCR amplifikace DNA

Složení PCR mixu pro 6 vzorků pro testované primery:

Deionizovaná voda	45 μ l
Storage Buffer 10x (10 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l KCl, 0,1 % Triton X-100)	6,7 μ l
Roztok MgCl ₂ o koncentraci 25 mmol/l	4,0 μ l
Roztok dNTPs o koncentraci 20 mmol/l	0,7 μ l
Primer F o koncentraci 10 μ mol/l	3,3 μ l
Primer R o koncentraci 10 μ mol/l	3,3 μ l
<i>aTaq</i> DNA polymeráza 5 U/ μ l	0,4 μ l

Mikrozkumavky byly po napipetování všech složek mixu zvortexovány a krátce zcentrifugovány.

Každá reakce sestávala z 9 μ l PCR mixu a 1 μ l roztoku DNA o koncentraci 50 μ g/ml.

Základní časový a teplotní profil PCR reakce byl následující:

1. 94 °C: 5 min
2. 35x: 94 °C: 30 s
50 °C: 30 s
72 °C: 30 s
3. 72 °C: 7 min

Tab. 1: Testované primery amplifikující polymorfní mikrosatelitové lokusy. V tabulce je uveden vždy zdrojový druh, od kterého byly mikrosatelitové lokusy odvozeny, tento druh je zařazen do řádu, dále jsou uvedeny použité mikrosatelity a autoři článku.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Autor
Brodiví	Čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)	Cc01, Cc02, Cc03, Cc04, Cc05, Cc06, Cc07	(Shephard <i>et al.</i> , 2009)
		CC1, CC3, CC7, CC9, CC10, CC13	(Segelbacher, osobní sdělení)
	Ibis japonský (<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)
	Ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Eru02, Eru03, Eru04, Eru05, Eru06, Eru07, Eru08, Eru09, Eru10, Eru11	(Santos <i>et al.</i> , 2006)
	Kolpík malý (<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)
	Kolpík růžový (<i>Ajaia ajaja</i>)	Aaju1, Aaju2, Aaju3, Aaju4, Aaju5, Aaju6	(Sawyer <i>et</i> Benjamin, 2006)
	Kvakoš noční (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	nycti14, nycti15, nycti22, nycti26, nycti35, nycti36, nycti41, nycti43, nycti62, nycti68, nycti74	(Chang <i>et al.</i> , 2009)
	Nesyt lesní (<i>Mycteria americana</i>)	Wsm03, Wsm08, Wsm09, Wsm13, Wsm14, Wsm17, Wsm18, Wsm19, Wsm20, Wsm23, Wsm24	(Tomasulo- Seccomandi <i>et al.</i> , 2003)
		WS1, WS2, WS4, WS6	(van den Bussche <i>et al.</i> , 1999)
Volavka velká (<i>Ardea herodias</i>)	Ah205, Ah208, Ah209, Ah210, Ah211, Ah212, Ah217, Ah320, Ah341, Ah343, Ah414, Ah421, Ah517, Ah522, Ah526, Ah536, Ah630	(McGuire <i>et</i> Noor, 2002)	
Volavka žlutozobá (<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)	

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Použitá literatura
Veslonoží	Fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18	(Dearborn <i>et al.</i> , 2008)
	Kormorán galapážský (<i>Phalacrocorax harrisi</i>)	PhB2, PhB4, PhB11, PhC11, PhD11, PhF12, PhG8, PhG12	(Duffie <i>et al.</i> , 2008)
	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, 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)
	Kormorán velký (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	PcD 2, PcD 4, PcD 5, PcD 6, PcT 1, PcT 3, PcT 4	(Piertney <i>et al.</i> , 1998)
	Pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265, PEL304	(de Ponte Machado <i>et al.</i> , 2009)
	Pelikán severoamerický (<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>)	PeEr01, PeEr02, PeEr03, PeEr04, PeEr05, PeEr06, PeEr07, PeEr08, PeEr09	(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)
	Terej guánový (<i>Sula variegata</i>)	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-95, Sv2A-152, Sv2B-27, Sv2B-138	(Taylor <i>et al.</i> , 2009)
Terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B-100	(Taylor <i>et al.</i> , 2009)	
	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)	
Plameňáci	Plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>)	Pruμ1, Pruμ2, Pruμ3, Pruμ4, Pruμ5, Pruμ6, Pruμ7, Pruμ8, Pruμ9, Pruμ13	(Kapil, 2005) (Preston, 2005) (Kapil <i>et al.</i> , 2010)

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Použitá literatura
Plameňáci	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)
Potápky	Potápka rudokrká (<i>Podiceps grisegena</i>)	PgAAT1, PgAAT3, PgAAT6, PgAAT8, PgAAT25, PgAAT34, PgAAT41	(Sachs <i>et Hughes</i> , 1999)
Potáplice	Potáplice lední (<i>Gavia immer</i>)	GimA9EPA, GimA12EPA, GimC5EPA, GimC11EPA, GimD9EPA, GimD12EPA, GimE11EPA	(McMillan <i>et al.</i> , 2004)
Dlouho- křídlí	Alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	Apy06, Apy07	(Dawson <i>et al.</i> , 2005)
Vrubozobí	Kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APH07, APH 09	(Maak <i>et al</i> , 2000)
		APH08, APH12, APH13, APH16	(Maak <i>et al</i> , 2003)
	Kachna pižmová (<i>Cairina moschata</i>)	CmAAT16, CmAAT35, CmAAT38	(Stai <i>et Hughes</i> , 2003)
	Kachnice laločnatá (<i>Biziura lobata</i>)	Blm1, Blm10, Blm12	(Guay <i>et Mulder</i> , 2005)
	Kajka mořská (<i>Somateria mollissima</i>)	Smo10	(Paulus <i>et Tiedemann</i> , 2003)
Tučňáci	Tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	AM13	(Roeder <i>et al.</i> , 2001)
Sudo- kopytníci	Pratur indický, zebu (<i>Bos indicus</i>)	HEL1	(Lei <i>et al</i> , 2005)

4.4 Zpracování PCR produktů

Tento postup byl optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 333 x 392 mm a 333 x 418 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

Větší sklo bylo důkladně omyto deionizovanou vodou po obou stranách a osušeno. Na ploše dotýkající se gelu bylo sklo ošetřeno přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů, který se nechal 5 minut zaschnout.

Menší sklo bylo omyto vodou se saponátem a opláchnuto deionizovanou vodou. Na ploše dotýkající se gelu byl rozetřen 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu s 3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu a nechalo se 5 minut zaschnout, poté bylo čtyřikrát opláchnuto 96% ethanolem.

Mezi obě skla byly po stranách položeny dva 0,4 mm silné spacers. V místě spacerů byla skla sepnuta na každé straně dvěma klipsy.

Gel byl připraven v kádince, promíchán a pak pomalu naléván mezi skla tak, aby byl celý prostor mezi skly vyplněn.

V místě nalévání gelu byl mezi skla vsunut hřebínek jeho rovnou stranou asi 1 cm hluboko a skla byla sepnuta čtyřmi klipsy. Doba polymerizace gelu byla nejméně 1 hodinu. Po utuhnutí gelu byla skla důkladně omyta od všech zbytků polyakrylamidu, osušena a upevněna do elektroforetické komůrky. Katodový i anodový prostor elektroforetické komůrky byl zalit 0,5 x TBE pufrem a byl vytáhnut hřebínek. Na zdroji stejnosměrného elektrického proudu byl jako limitní faktor nastavena hodnota výkonu 90 W, hodnoty elektrického napětí i proudu byly nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA. Gel se nechal předeřtát asi 30 minut, až teplota gelu dosáhla na 48 °C.

Do vzorků bylo napipetováno 5 μ l nanášecího pufru a vzorky byly vloženy na 4 minuty do denaturačních podmínek do termocykléru vytemperovaného na 94 °C. Po vytažení byly mikrozkušavky ihned vsunuty do ledové tříště.

Do mezery mezi skly byl vsunut hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu. Poté bylo nanášeno po 2 μ l jednotlivých vzorků osmikanálovou pipetou do mezer mezi zoubky hřebínku. Po napipetování všech vzorků byla jako limitní faktor nastavena hodnota výkonu 70 W. Hodnoty elektrického napětí i proudu byly nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA. Elektroforéza probíhala 1 až 3 hodiny.

Po uplynutí času elektroforetického dělení vzorků byl gel se skly vyjmut, z prostoru mezi skly byly vytaženy oba spacery a skla byla od sebe odpáčena čepelí nože. Odchlípené menší sklo s přilepeným gelem bylo otočeno gelem nahoru a uloženo do fotomisky, umístěno na třepačku a zalito fix/stop roztokem, který na gel působil přibližně 20 minut až do vymytí modrého pruhu xylenové modře z gelu do roztoku.

Fix/stop roztok byl slit zpět do baňky a sklo s gelem bylo 3 krát promyto přibližně 1,5 l deionizované vody. Poté následovalo 5 minutové promytí gelu na třepačce v 1% roztoku HNO_3 , vylití tohoto roztoku a 4 krát promytí gelu přibližně 1,5 l deionizované vody.

Dále bylo sklo s gelem umístěno na třepačku do 0,1% roztoku AgNO_3 , do kterého bylo těsně před použitím přidáno 1,2 ml formaldehydu a tento roztok se nechal na gel působit přibližně 30 minut. Na konci této doby byla připravena jedna fotomiska s 1,5 l deionizované vody a druhá fotomiska s vychlazenou vývojkou, do které bylo přidáno 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Roztok AgNO_3 byl slit zpět do zásobní lahve. Sklo s gelem bylo na 5 vteřin ponořeno do misky s deionizovanou vodou a po okapání přemístěno do fotomisky s vývojkou umístěnou na třepačce, kde bylo sledováno vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů.

Po dostatečném zviditelnění proužků bylo vyvíjení zbarvení zastaveno přilitím uchovaného fix/stop roztoku, který se nechal působit asi 2 minuty. Sklo s gelem bylo poté ponořeno asi na 2 minuty do deionizované vody, následně bylo přeneseno na 1 hodinu do sušárny, kde byl gel při 60 °C vysušen. Vysušené sklo bylo vyhodnoceno na negatoskopu, případně nascanováno. Sklo s již nepotřebným gelem bylo na několik hodin ponořeno do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l. Gel se tímto od skla odlepil, sklo bylo umyto a bylo znovu připraveno k použití.

4.5 Použité chemikálie

Akrylamid (Serva)

aTaq DNA polymeráza (5U/ μ l), M1241 (Promega)

Bromfenolová modř (Serva)

Deionizovaná voda

Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400 μ l každého), U1240 (Promega)

Dusičnan stříbrný (Lachema)

Ethanol – 96% roztok (Seliko Olomouc)

Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachema)

Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Lachema)

Formaldehyd (Lachema)

Formamid (Lachema)

Hydroxid sodný (Lachema)

Chlorid sodný (Lachema)

Kyselina boritá (Lachema)

Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)

Kyselina octová – ledová (Lachema)

3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

Močovina (Lachema)

N-lauroylsarkosin (Sigma)

N,N'-metylenbisakrylamid (Serva)

N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)

Peroxodisíran amonný (Serva)

Rain-X – přípravek odpuzující vodu ze skel automobilů (Pennzoil-Quaker State)

Thiosíran sodný (Lachema)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)

Uhličitan sodný (Lachema)

Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.6 Použité roztoky

Zásobní roztok 6% akrylamidu:

420 g močoviny

484 ml deionizované H₂O

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

Zásobní roztok 10 x TBE pufru:

108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)

55 g kyseliny borité H₃BO₃

40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0

doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Roztok 10% peroxidisíranu amonného:

1 g (NH₄)₂S₂O₈

rozpustit v 10 ml deionizované vody

uchovávat v mikrozkušavkách po 400 µl v -20 °C

Roztok 3 – methakryloxypropyltrimethoxysilanu:

1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu

3 µl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Polyakrylamidový 6% gel:

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

400 µl 10 % roztoku peroxidisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈

40 µl N, N, N', N' – tetramethylethyldiaminu

Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

0,125 g bromfenolové modře

0,125 g xylenové modře

25 ml deionizované vody

100 ml formamidu

Fix/stop roztok:

80 ml ledové kyseliny octové
objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

Roztok 1% kyseliny dusičné HNO₃:

12 ml 65% HNO₃
objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného AgNO₃:

0,8 g AgNO₃
objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml
před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Vývojka:

24 g uhličitanu sodného Na₂CO₃
objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml
uložit ve 4 °C
před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného Na₂S₂O₃

Queen's pufr:

10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,8
2 ml zásobního roztoku NaCl (5 mol/l)
2,92 g ethylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA)
10 g N-lauroylsarkosinu
rozpustit v 900 ml deionizované vody
pH upravit na 7,5
doplnit deionizovanou vodou na 1000 ml

Roztok hydroxidu sodného NaOH 1 mol/l:

40 g hydroxidu sodného
doplnit deionizovanou vodou na 1 l

TE pufr:

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

Fenol pro izolaci DNA pH 7,9 ± 0,2:

100 ml fenol (Sigma P-4557) pH 6,7 ± 0,2

6,5 ml ekvilibrační pufr pH 10,5 (Sigma B-5658) (Tris 0,01 mol/l pH 8,0,

EDTA 0,001 mol/l)

protřepat a nechat 2 – 4 hodiny stát

uchovávat max. 6 měsíců ve 4 °C

Roztok octanu sodného CH₃COONa 3 mol/l:

408,24 g trihydrátu octanu sodného CH₃COONa . 3 H₂O

rozpustit v 800 ml deionizované H₂O

upravit pH na hodnotu 5,2 pomocí ledové kyseliny octové

objem doplnit deionizovanou H₂O na 1 l

4.7 Použité laboratorní přístroje

Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)

Laboratorní váhy EK-200g (AND)

Mikropipety Finnpiette 0,5 až 10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)

Mikropipety Nichipipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)

Minicentrifuga E – centrifuge (Wealtec)

Negatoskop NEGA 1 (Maneko)

Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)

Sušárna HS 122S (Chirana)

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

Termocyklér XP Thermal Cycler (BIOER technology)

Třepačka Orbit 1900 (Labnet international)

Vortex MS2 (Ika)

Výrobník deionizované a ultračisté vody (Aquaosmotic)

Výrobník ledu Icematic F 100 Compact (Castel Mac)

5 VÝSLEDKY

6 DISKUSE

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala analýzou polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*).

Na DNA šesti nepříbuzných jedinců volavky rusohlavé byla provedena *cross-species* mikrosatelitová amplifikace primerů odvozených z DNA taxonomicky příbuzných druhů ptáků. Na DNA volavky rusohlavé byly otestovány primery amplifikující polymorfní mikrosatelitové lokusy odvozené z DNA čápa bílého (*Ciconia ciconia*), ibise japonského (*Nipponia nippon*), ibise rudého (*Eudocimus ruber*), kolpíka malého (*Platalea minor*), kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), nesyta lesního (*Mycteria americana*), volavky velké (*Ardea herodias*), volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*), fregatky obecné (*Fregata minor*), kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), tereje červenonohého (*Sula sula*), tereje guánového (*Sula variegata*), tereje modronohého (*Sula nebouxii*), plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*), potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*), potáplice lední (*Gavia immer*), alkounka drobného (*Aethia pygmaea*), kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), kachny pižmové (*Cairina moschata*), kachnice laločnaté (*Biziura lobata*), kajky mořské (*Somateria mollissima*), tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*) a pratura indického (*Bos indicus*).

Bylo nalezeno 42 polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených z DNA čápa bílého (*Ciconia ciconia*), ibise japonského (*Nipponia nippon*), ibise rudého (*Eudocimus ruber*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), nesyta lesního (*Mycteria americana*), volavky velké (*Ardea herodias*), volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*), fregatky obecné (*Fregata minor*), kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), tereje modronohého (*Sula nebouxii*), plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) a potáplice lední (*Gavia immer*). U těchto mikrosatelitů byla zoptimalizována teplota annealingu a doba separace v 6% polyakrylamidovém gelu, aby bylo dosaženo co nejlepší vizualizace.

Tyto polymorfní mikrosatelitové lokusy budou dále použity pro studium paternity a dalších příbuzenských vztahů u volavky rusohlavé.

8 SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
G	guanin
kb	kilobáze
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	ribonukleová kyselina
T	tymin
T _a	teplota annealingu (<i>annealing temperature</i>)
T _m	teplota tání (<i>melting temperature</i>)

9 POUŽITÁ LITERATURA

Bejček V., Šťastný K. (1999): Encyklopedie ptáků. Rebo Productions, Čestlice.

Brown T. A. (2007): Klonování genů a analýza DNA. Úvod. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

van den Bussche R. A., Harmon S. A., Baker R. J. *et al.* (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the Wood Stork (*Mycteria americana*). *The Auk*, 116, 1083-1092.

Campbel N. A., Reece J. B. (2006): Biologie. Computer Press, Brno.

Chang Q., Cao F-H, Zhu L-F, Zhang B-W, Zhou K-Y (2005): Microsatellite variation and genetic diversity in the black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* in the lower reaches of Yangtze River. *Acta Zoologica Sinica*, 51, 657-663.

Chang Q., Xie Z., Li Q., Zhou K. (2009): Microsatellite loci developed for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservative genetics*, 10, 1537-1539.

Dawson D. A., Hunter F. M., Pandhal J. *et al.* (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.

Dearborn D. C., Hailer F., Fleischer R. C. (2008): Microsatellite primers for relatedness and polation structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Frigatidae). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1399-1401.

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.

Faircloth B. C., Ramos A., Drummond H., Gowaty P. A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxii*). *Conservation Genetic 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. 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.

Guay P.-J., Mulder R. A. (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.

Hanzák, J., Hudec, K. (1974): Světem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci. Albatros, Praha. Druhé přepracované a doplněné vydání.

He L-P, Wan Q-H, Fang S-G, Xi Y-M (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics*, 7, 157-160.

Hickman C. R., Peters M. B., Crawford N. G. *et al.* (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1439-1441.

Howard, R., Moore, A. (1994): A Complete Checklist of the Birds of the World. Second edition. Academic Press.

Huang X., Zhou X., Chen M., Fang W., Chen X. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics*, in press.

Ji Y-J, Liu Y-D, Ding C-Q, Zhang D-X (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes*, 4, 615-617.

Kapil R. (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamenco populations. Ph.D. dissertation, University of North Texas, USA, published online (www.unt.edu).

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

Klug W. S., Cummings, M. R. (1997): Concepts of Genetics. Fifth edition. Prentice-Hall Inc.

Lei Ch-Z, Fan G-L, Zhang Y-D, Qiu R-B, Chen H. (2005): Genetic polymorphism in a cultured population of the crested ibis *Nipponia nippon*. *Acta Zoologica Sinica*, 51, 650-656.

Lewis A. (1991): The Hamlyn Photographic Guide to Birds of the World. Paul Hamlyn Publishing Ltd., London.

Lowe K. W. (1994): Encyklopedický průvodce světem zvířat. Obratlovci. Nakladatelský dům OP Praha.

- Lowe K. W., Olsen, P. (1998): Encyclopedia of Birds. Second edition. Weldon Owen Production.
- Maak S., Neumann K., von Lengerken G., Gattermann R. (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics*, 31, 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.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- McGuire H. L., Noor M. A. F. (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes*, 2, 170-172.
- McMillan A. M., Bagley M. J., Evers D. C. (2004): Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). *Molecular Ecology Notes*, 4, 297-299.
- Mercer D. M., Haig S. M., Mullins T. D. (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetic Resources*, in press.
- Misra M., Srivastava M. D. L. (1976): Somatic chromosomes of *Bubulcus ibis* (L.) (Cattle-greg): A case of reciprocal translocation. *Genetica*, 46, 155-160.
- 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.
- Paulus K. B., 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 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.
- Primmer C. R., Moller A. P., Ellegren H. (1996): A wide-range survey of *cross-species* microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365-378.
- Preston E. L. (2005): Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Doctoral Thesis. University of North Texas, published online (www.unt.edu).

- Roeder A. D., Marshall R. K., Mitchelson A. J. et al. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10, 1645-1656.
- 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 onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservative Genetics*, 10, 1033-1036.
- Sachs J. L., Hughes C. R. (1999): Characterization of microsatellite loci for red-necked grebes *Podiceps grisegena*. *Molecular Ecology*, 8, 687-688.
- Santos M. S., Goncalves E. C., Barbosa M. S. R., Silva A., Schneider M. P. C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes*, 6, 307-309.
- Sawyer G. M., Benjamin R. C. (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 677-679.
- Shephard J. M., Gabulsera P., Hellemans B., Jusic A., Akhandaf Y. (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics*, 10, 1525-1528.
- Stai S. M., Hughes C. R. (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics*, 34, 387-389.
- 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*, in press.
- Tomasulo-Seccomandi A. M., Schable N.A., Bryan A. L. Jr. et al. (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 563-566.
- Wilson R. (2008): Sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) – Modern samples. Summer Studentship 2007/2008, published online (awcmee.massey.ac.nz).
- Yeung C. K. L., Hsu Y-C, Yao C-T, Li S-H (2009): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics*, 10, 1081-1084.
- Veselovský Z. (2001): Obecná ornitologie. Academia, Praha.