

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2010**

**Kateřina Sklenářová**

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



**Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity  
u volavčíka člunozobého (*Cochlearius cochlearius*)**

**Diplomová práce**

**Kateřina Sklenářová**

**Studijní program: Biologie**

**Studijní obor: Učitelství biologie a geografie pro střední školy**

**Forma studia: prezenční**

**Olomouc 2010**

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu navazujícího magisterského studia na Univerzitě Palackého v Olomouci, pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. K vypracování této práce jsem použila literární zdroje uvedené v seznamu literatury.

V Olomouci dne 10.5.2010

---

Chtěla bych poděkovat mému vedoucímu práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho čas a trpělivost, které mi věnoval během psaní této práce, za jeho cenné rady a vysvětlení problematiky, která je náplní mé diplomové práce.

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“.

## Bibliografická identifikace

**Jméno a příjmení autora:** Kateřina Sklenářová

**Název práce:** Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u volavčíka člunozobého (*Cochlearius cochlearius*)

**Typ práce:** Diplomová práce

**Pracoviště:** Laboratoř populační genetiky, Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

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

**Rok obhajoby práce:** 2010

**Klíčová slova:** volavčík člunozobý, *Cochlearius cochlearius*, *cross-species* PCR amplifikace, mikrosatelitové lokusy, paternita, ZOO Dvůr Králové nad Labem

**Počet stran:** 67

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** český

## Souhrn

V této diplomové práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů pro volavčíka člunozobého (*Cochlearius cochlearius*). Hledání probíhalo za použití *cross-species* PCR amplifikace již dříve známých polymorfních mikrosatelitových lokusů od příbuzných druhů ptáků.

Ptáci pocházeli z řádu brodiví (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes) a veslonozí (Pelecaniformes). K dispozici byly také další mikrosatelitové lokusy dalších skupin velkých vodních ptáků, proto jsem je také zahrнула do testování.

Celkem jsem otestovala 340 párů primerů na 6 jedincích volavčíka člunozobého, ze kterých jsem našla 34 polymorfních lokusů. Úspěšnost polymorfní PCR amplifikace u volavčíka člunozobého byla 10 %.

U každého mikrosatelitu proběhla optimalizace teploty annealingu PCR, počtu cyklů v PCR a doby elektroforetické separace produktů v 6% polyakrylamidovém gelu.

Pro každý polymorfní mikrosatelit byla provedena genotypizace na 8 jedincích chovaných v ZOO Dvůr Králové nad Labem. Ogenotypovaní jedinci měli 2 až 5 alel. Pomocí programu CERVUS 3.0.3 byly následně zjištěny statistické parametry pro jednotlivé lokusy.

Studie mikrosatelitových lokusů byla na druhu volavčík člunozobý (*Cochlearius cochlearius*) provedena poprvé a v této práci je tedy uveden první set polymorfních mikrosatelitů, které by mohly posloužit pro determinaci paternity, při studiu biologie a genetické variability jednotlivých poddruhů volavčíka člunozobého.

## **Bibliographical identification**

**Author 's first name and surname:** Kateřina Sklenářová

**Thesis:** The analysis of microsatellite loci for determination of paternity in Boat-billed heron (*Cochlearius cochlearius*)

**Type of thesis:** Diploma thesis

**Department:** Laboratory of population genetics, Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

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

**The year of presentation:** 2010

**Key words:** Boat-billed heron, *Cochlearius cochlearius*, cross-species PCR amplification, microsatellites, paternity, Zoo Dvůr Králové nad Labem

**Number of pages:** 67

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech



## Summary

In this diploma thesis I was looking for polymorphic microsatellite loci for Boat-billed heron (*Cochlearius cochlearius*). This searching employed *cross-species* amplification of known polymorphic microsatellite loci from related bird species. These related birds originated from orders Ciconiiformes, Phoenicopteriformes and Pelecaniformes. Several available microsatellite loci from other groups of water birds were also included in testing.

I was testing overall number of 340 primer pairs on 6 individuals of Boat-billed heron in which I found 34 polymorphic loci. The successful rate of polymorphic *cross-species* amplification in Boat-billed heron thus was 10 %.

The annealing temperature of PCR, numbers of PCR cycles and time of electrophoretic separation in 6% polyacrylamid gel have been optimized for each locus.

Final genotypes of 8 individuals were determined for each polymorphic locus. These individuals are kept in Zoo Dvůr Králové nad Labem. Genotyped loci of these individuals had from 2 to 5 alleles. Using CERVUS 3.0.3 software were obtained statistical characteristics for individual loci.

This study of microsatellites was performed on Boat-billed heron for the first time. Therefore, results of this thesis represent a very first set of polymorphic microsatellites which could be used in paternity determination, population study and study of genetic variability of particular subspecies of Boat-billed heron.

## Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Cíle.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Současný stav řešené problematiky.....</b>	<b>4</b>
3.1 Charakteristika zkoumaného druhu .....	4
3.1.1 Charakteristika řádu brodiví (Ciconiiformes).....	4
3.1.2 Charakteristika čeledi volavkovití (Ardeidae).....	5
3.1.3 Charakteristika druhu volavčik člunozobý .....	6
3.2 Repetitivní sekvence DNA .....	10
3.2.1 Rozdělení tandemových repetitivních DNA .....	11
3.3 Mikrosatelitová DNA.....	11
3.3.1 Využití mikrosatelitů .....	12
3.3.1.1 Analýza paternity a příbuznosti .....	12
3.3.1.2 PCR amplifikace DNA .....	13
3.3.2 Hledání mikrosatelitových lokusů .....	13
3.3.3 <i>Cross-species</i> PCR amplifikace .....	13
3.4 Problémy při analýze mikrosatelitů .....	14
3.5 Mikrosatelity u brodivých (Ciconiiformes) .....	14
3.6 Mikrosatelity u plameňáků (Phoenicopteriformes) .....	17
3.7 Mikrosatelity u veslonohých (Pelecaniformes) .....	17
3.8 Mikrosatelity u potápek a potáplic.....	19
<b>4. Materiál a metody .....</b>	<b>21</b>
4.1 Biologický materiál.....	21
4.2 Izolace DNA .....	21
4.3 PCR amplifikace DNA .....	22
4.4 Elektroforéza DNA a analýza gelů .....	26
4.5 Chemikálie .....	28
4.6 Roztoky .....	29
4.7 Přístrojové vybavení .....	30
<b>5. Výsledky.....</b>	<b>32</b>
<b>6. Diskuse .....</b>	<b>54</b>
<b>7. Závěr .....</b>	<b>60</b>
<b>8. Seznam použité literatury .....</b>	<b>61</b>
<b>9. Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>67</b>

# 1. Úvod

Volavčík člunozobý (*Cochlearius cochlearius*) je vzhledově netypický zástupce čeledi volavkovitých (Ardeidae). Obývá oblasti Střední a Jižní Ameriky, žije zejména v okolí vodních ploch a toků. Ve svém přirozeném prostředí je druhem běžným, není ohrožen.

Díky svému atraktivnímu vzhledu bývá volavčík člunozobý často chovaný v zajetí, v zoologických zahradách. V České republice ho můžeme najít hned ve třech ZOO.

Do dnešní doby nebyl tento druh molekulárně studován, proto pro něj nejsou známy žádné mikrosatelity, které by umožnily studium paternity, genetické variability jeho populací a determinaci jeho poddruhů.

Tato práce je tedy zaměřená na nalezení mikrosatelitových lokusů u volavčíka člunozobého na základě *cross-species* amplifikace mikrosatelitů známých od taxonomicky příbuzných vodních ptáků, především od brodivých (Ciconiiformes), plameňáků (Phoenicopteriformes) a veslonohých (Pelecaniformes).

## 2. Cíle

- 1) Vytvořit literární rešerši na téma diplomové práce.
  
- 2) Otestovat *cross-species* amplifikaci mikrosatelitových lokusů u volavčíka člunozobého (*Cochlearius cochlearius*) s použitím párů primerů, které byly dříve zjištěny jako polymorfní u ptáků řádu brodiví (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes) a veslonozí (Pelecaniformes).
  
- 3) U nalezených polymorfních mikrosatelitů zoptimalizovat podmínky PCR reakce a elektroforetické separace produktů.
  
- 4) U 8 jedinců volavčíka člunozobého pocházejících ze ZOO Dvůr Králové nad Labem vygenotypovat všechny mikrosatelity a na základě zjištěných dat vytvořit statistickou charakteristiku jednotlivých mikrosatelitů.

### 3. Současný stav řešené problematiky

#### 3.1 Charakteristika zkoumaného druhu

Zařazení druhu volavčík člunozobý do systému (www.biolib.cz, 2009):

Říše:	Animalia (živočichové; Linnaeus, 1758)
Oddělení:	Bilateria (Hatschek, 1888)
Pododdělení:	Deuterostomia (druhoústí)
Kmen:	Chordata (strunatci; Bateson, 1885)
Podkmen:	Vertebrata (obratlovci; Cuvier, 1812)
Třída:	Aves (ptáci; Linnaeus, 1758)
Řád:	Ciconiiformes (brodiví)
Čeleď:	Ardeidae (volavkovití; Leach, 1820)
Rod:	<i>Cochlearius</i> (volavčík; Brisson, 1760)
Druh:	<i>Cochlearius cochlearius</i> (volavčík člunozobý; Linnaeus, 1766)

##### 3.1.1 Charakteristika řádu brodiví (Ciconiiformes)

Většinou se jedná o velké ptáky s dlouhýma nohama, protáhlým štíhlým krkem a dlouhým zobákem. Brodiví žijí převážně na okrajích vnitrozemských vodních toků. Neplavou, brodí se v mělčinách, proto mají dlouhé tenké nohy, protáhlé zejména v běháku a bérci, a u některých druhů se mezi prsty nachází krátká plovací blána proti propadání do bláta. Některé druhy (marabu) jsou adaptovány k životu v suchém prostředí (Dimitrijevič, 1991).

Zobák většiny druhů je dlouhý, přímý a klínovitý, někteří zástupci čápoovitých (Ciconiidae) mají zobák mohutný, ibisovití (Threskiornithidae) mají štíhlý, dolů zahnutý zobák (Dimitrijevič, 1991).

Zbarvení je u obou pohlaví většinou stejné, samice bývají poněkud menší, mívají méně vyvinutá ozdobná pera, mladí ptáci často vypadají zcela odlišně. V opeření se dost často objevují holá kožovitá místa, více druhů má prodloužená ozdobná pera na hlavě a na krku (Hudec *et al.*, 1994).

Žijí v monogamii, větší počet druhů hnízdí v koloniích, běžně i více druhů pospolu. Staví si zpravidla poměrně velká hnízda z větví v korunách stromů, užívají je i po více let a neustále je přistavují. Na stavbě hnízda se podílejí oba budoucí rodiče.

Mláďata krmivého typu jsou po vylíhnutí z vajec bezbranná holátka, vyžadující velkou péči. Vyznačují se však rychlým růstem. Krmena jsou oběma rodiči, potrava je jim vyvrhována do hnízda, u volavkovitých (Ardeidae) je zprvu vyvrhována přímo do zobáků (Šťastný *et al.*, 1998).

Potrava je u všech druhů živočišná. Převážnou část jejich kořisti tvoří ryby, obojživelníci, drobní savci, plazi a z bezobratlých hlavně hmyz a červi. Několik druhů (marabu) je přizpůsobeno k požívání mršin (Šťastný *et al.*, 1998).

Zástupci řádu jsou mimo polárních oblastí rozšířeni kosmopolitně, těžištěm výskytu jsou tropické, popřípadě alespoň teplé oblasti. Druhy z chladnějších oblastí bývají z větší části tažné, delší migrační přesuny vyvolané změnami zdrojů potravy podnikají i některé druhy z tropů (Burnie, 2002).

Do tohoto řádu patří následující čeledi: volavkovití (Ardeidae), čápoovití (Ciconiidae), ibisovití (Threskiornithidae), kladivoušovití (Scopidae) a člunozobcovití (Balaenicipitidae) (Gosler, 1994).

Jednotlivé čeledi se od sebe dají nejlépe odlišit podle tvaru zobáku - volavky mají dlouhý, špičatý zobák, zobák čápů je velmi podobný volavkám, ale často bývá před špičkou zahnutý nahoru nebo dolů, ibisové mají dlouhý, tenký a dolů zahnutý zobák, kolpíci (také zástupci čeledi ibisovití) mají zobák zploštělý, na konci se rozšiřující, člunozobec se vyznačuje mohutným a širokým zobákem (Gosler, 1994; Šťastný *et al.*, 1998).

### 3.1.2 Charakteristika čeledi volavkovití (Ardeidae)

Volavky jsou štíhlí, středně velcí až velcí ptáci (30 - 140 cm, 0,1 až 3 kg) s dlouhým, špičatým zobákem, dlouhým krkem a nohama (Gosler, 1994). Zvláštní kloubní úprava dlouhého šestého obratle umožňuje esovité prohnutí krku, které je důležité funkční přizpůsobení na harpunování kořisti. Tento vystřelovací mechanismus je umocněn rychlým pohybem krku jen v jedné rovině dopředu, do stran je krk velmi neohebný. Při letu je krk složený esovité na hřbet (Šťastný *et al.*, 1998).

Na nohou mají 4 dlouhé prsty bez plovacích blan s drápy. Dráp na prostředním prstu je opatřen hřebenem (Gosler, 1994). Hřebínkovité zářezy využívají volavky k čištění a česání peří (Šťastný *et al.*, 1998).

Život volavek je těsně svázaný s vodou. Jejich kostrční žláza však nevylučuje dostatek tuku k promazávání veškerého peří. Jako náhradu volavky používají tzv.

puškový prach (Dimitrijevič, 1991). Jsou to drobné částičky křehkého prachového peří z prsních pernic a ze zad, které volavky nanášejí zobákem na obrysové peří. Prach zabráňuje slepování peří (Šťastný *et al.*, 1998). Kalná voda s příměsí bahna snadno znečistí povrch těla, proto si volavky čistí peří tak, že jej pročešávají hřebenem na prostředním drápu a odstraňují spolu s tenkou vrstvou drobného prachu všechny nečistoty (Dimitrijevič, 1991).

U některých druhů se vyskytují různé barevné fáze a občas jsou v přírodě zjišťování kříženci různých druhů. Proto je ornitologové někdy omylem popisovali jako samostatné druhy (Šťastný *et al.*, 1998).

Na hlavě mají volavky často dlouhá, ozdobná pera, která ve svatebním šatě využívají při toku. Zbarvení volavek bývá nejčastěji hnědavé, černé, bílé nebo šedavé. Samci jsou zpravidla větší než samice (Gosler, 1994).

Zástupce čeledi volavkovitých najdeme na celém světě s výjimkou polárních oblastí (Gosler, 1994). Ptáci hnízdící v teplých krajích na zimu neodlétají. Hnízdí-li v chladnějších klimatických pásmech, odlétají na podzim na jih a brzy na jaře se vracejí (Dimitrijevič, 1991). Jejich typickým prostředím jsou mělké vody, slané i sladkovodní mokřady, včetně porostů mangrovů (Šťastný *et al.*, 1998).

Hnízdí jednotlivě nebo v koloniích, hnízda staví na zemi nebo na stromech (Gosler, 1994). Hnízdo volavek je velké, stavějí ho oba partneři, samec začíná shánět stavební materiál ještě před přiletem samice. Volavky zpravidla začínají hnízdit až v druhém roce života a při hnízdění se potom věrně vracejí každý rok do stejných míst (Dimitrijevič, 1991).

Samice klade 2-7 vajec, která jsou bělavá až modrá, částečně mohou na sobě mít i kresbu. Inkubační doba je 18-30 dní. Na hnízdě se střídají oba rodiče. Mláďata jsou krmivá, hnízdo opouštějí po 35 až 65 dnech (Gosler, 1994).

Kořistí volavek jsou myši a jiní drobní savci, dále hmyz, ale především ryby, obojživelníci a malí vodní živočichové (Dimitrijevič, 1991).

Zástupci této čeledi mají svérázné hlasové projevy, doprovázejí hlasem většinou agresivní chování nebo tokání (Šťastný *et al.*, 1998).

### 3.1.3 Charakteristika druhu volavčík člunozobý

Volavčík člunozobý, latinsky *Cochlearius cochlearius*, anglicky Boat-billed heron, byl dříve nazýván člunozobec americký nebo také kvakoš člunozobý. Důvodem

tohoto pojmenování je charakteristický tvar jeho zobáku, který je enormně široký a lžicovitý (Gosler, 1994).

Oblast výskytu volavčíka člunozobého můžeme zařadit do neotropické zoogeografické oblasti. Tato oblast zaujímá jižní část Střední Ameriky a Jižní Ameriku po severní Argentinu (Gosler, 1994). Těžiště výskytu se nachází mezi obratníkem Raka na severu ( $23^{\circ} 30'$  s.š.) a směrem na jih jeho rozšíření zasahuje až pod  $30^{\circ}$  j.š. Mezi nejčastější přirozené biotopy, které v těchto oblastech obývá, patří mangrovy, břehy moří, husté porosty podél vod v tropických lesích a sladkovodní bažiny. Vyskytuje se max. do 650 metrů nad mořem (Del Hoyo *et al.*, 1992).



Obr.1 Rozšíření volavčíka člunozobého (*Cochlearius cochlearius*) (Del Hoyo *et al.*, 1992)

Celkově je uznáváno pět poddruhů volavčíka člunozobého, které se liší oblastí výskytu:

- *Cochlearius cochlearius zeledoni* (Ridgway, 1885) – západní a centrální Mexiko;
- *Cochlearius cochlearius phillipsi* (Dickerman, 1973) – východní Mexiko a Belize;
- *Cochlearius cochlearius ridgwayi* (Dickerman, 1973) – jižní Mexiko až západní Honduras a Salvador;
- *Cochlearius cochlearius panamensis* (Griscom, 1926) – Costa Rica a Panama;
- *Cochlearius cochlearius cochlearius* (Linnaeus, 1766) – východní Panama až Guinea, Severní Amazonie až severovýchodní Argentina.



Díky rozlehlé oblasti rozšíření bývá tento druh rozdělován na tzv. Northern Boat-billed Heron – tzv. severní větev, kam patří poddruhy *zeledoni*, *phillipsi* a *ridgwayi*; a na Southern Boat-billed Heron – tzv. jižní větev, kam bývá zařazen poddruh *cochlearius* a *panamensis* (Del Hoyo *et al.*, 1992).

Tři severní poddruhy bývají někdy považovány za samostatné druhy (Del Hoyo *et al.*, 1992).

Právě pro silný a široký zobák (7,5 cm dlouhý a 5 cm široký) bývá někdy volavčík člunozobý řazen do zvláštní čeledi volavčíkovití (Cochleariidae). Funkce jeho nezvykle tvarovaného zobáku není dosud přesně známa, patrně souvisí se způsobem získávání potravy. Předpokládá se, že volavčík kořist do svého zobáku nabírá (Šťastný *et al.*, 1998).

Tradičně býval považován za nejbližšího příbuzného kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), ale podrobnější studium DNA ukázala příbuznost s bukačem (*Tigrisoma*) (Del Hoyo *et al.*, 1992).



Obr. 2 Volavčík člunozobý (*Cochlearius cochlearius*) (Pivoňka, 2005)

Délkou těla 45 až 51 cm se řadí mezi velikostně menší zástupce čeledi volavkovitých.

Dospělý jedinec je na krku, chocholce a horní části hřbetu černě zbarvený. Samice má kratší ozdobná pera v týlu hlavy (Del Hoyo *et al.*, 1992). V případě nebezpečí nebo rozčilení je volavčík schopen tato dlouhá pera na hlavě načepýřit (Šťastný *et al.*, 1998). Čistě bílou barvu najdeme u volavčíka pouze na čele a lících. Ve zbarvení svrchní části těla existuje více variant podle toho, zda se vyskytují spíše ve Střední nebo Jižní Americe. Středoamerická forma (tzv. severní větev) má tmavě šedou svrchní část těla a žlutohnědou hrud'. Oproti tomu je jihoamerická forma (tzv. jižní větev) zbarvená světleji – světle šedá svrchní část těla a bělavá hrud'. Obě barevné varianty mají společnou rezavou barvu břicha a bělavé boky (Gosler, 1994).

Mláďata a mladí ptáci nemají vyvinutou chocholku a zbarvení jsou poněkud tmavěji než dospělí jedinci. Mladého volavčíka poznáme podle rezavě hnědé svrchní části těla a žlutohnědě bílé spodní strany (Gosler, 1994).

Zajímavostí u tohoto druhu je, že jedinci se nedorozumívají vizuálně (postoji a ritualizovanými pohyby), jako je tomu u většiny příbuzných volavek (Del Hoyo *et al.*, 1992). Komunikují především akusticky, proto je jejich hlasový repertoár velmi výrazný. Využívají buď hlasový projev - zpěv, hluboké skřehotavé volání, nebo případně projev mechanický - klapání zobáku (Šťastný *et al.*, 1998).

Dalším typickým znakem tohoto druhu jsou velké oči, které svědčí o aktivitě za soumraku a nočním způsobu života.

Jedinci většinou loví samostatně a to tak, že z místa, kde hradují, zalétají na stálá oblíbená loviště. Jen občas lze volavčíky spatřit, jak loví ve větším počtu. Jeho potravu tvoří převážně vodní živočichové – různé druhy korýšů, hmyzu, obojživelníků a ryb, také malí savci (Gosler, 1994).

Rozmnožování a období hnízdění je vázáno na roční období související s deštěm, které připadá v různých oblastech na různou část roku, obecně od června do listopadu. Volavčíci hnízdí jednotlivě nebo v malých skupinách o počtu 5 až 6 párů (Del Hoyo *et al.*, 1992). Výjimkou není hnízdění ve smíšených koloniích. Hnízda si staví na keřích nebo na stromech ve výšce 0,4 až 10 metrů nad povrchem nebo vodou. Hnízdo, postavené z větví listnatých stromů, je zpočátku docela malé, ale postupně se může zvětšovat, je-li opakovaně využíváno i po další roky. Na vejcích, kterých bývá v průměru jedno až čtyři, se střídají oba rodiče. Délka inkubace trvá 23 až 28 dní. V prvních dnech po vylíhnutí přijímají mláďata potravu pouze v nočních hodinách.

Samec i samice volavčíka jsou velmi starostlivými rodiči, kteří hnízdo i potomky během hnízdění aktivně brání a chrání (Šťastný *et al.*, 1998).

Tento druh není na svých přirozených stanovištích a biotopech ohrožen. Nejsou dostupné žádné konkrétní údaje o počtech a velikostech populací. Bývá popisován jako běžný hnízdič v různých částech Mexika (př. Maismas Nacionales, delta řeky San Pedro, v jihozápadním pobřeží Oaxaca odhadem hnízdí asi 300 párů). V roce 1980 se populace v národním parku Palo Verde v Costa Rice odhadovala na 210 párů. Počet párů hnízdících v Crooked Tree Lagoon v Belize se udává okolo čtyř set. Také v Nikaragui, Surinamu a Kolumbii se vyskytuje poměrně běžně (Del Hoyo *et al.*, 1992).

V České republice se v současné době chová ve 3 zoologických zahradách. A to v ZOO Zlín – Lešná, ZOO Praha a ZOO Dvůr Králové nad Labem. V Zoologické zahradě Zlín – Lešná v počtu 1 dospělá samice, 1 dospělý samec a 2 jedinci neurčeného pohlaví. V Zoologické zahradě Praha v počtu čtyři dospělí samci a čtyři dospělé samice. V Zoologické zahradě ve Dvoře Králové nad Labem v počtu tři dospělí samci a čtyři dospělé samice. Uvedené počty jsou platné k 31.12.2008 (Hofrichterová, 2008).

### 3.2 Repetitivní sekvence DNA

DNA můžeme v buňkách najít v několika různých typech sekvencí. Jedná se o sekvence kódující i nekódující, které mohou být jedinečné anebo se mohou v genomu nacházet ve více identických nebo podobných kopiích. Sekvence DNA, které mají vysoké množství kopií, se nazývají repetitivní sekvence.

Tzv. jedinečné sekvence DNA (Alberts *et al.*, 1998) se nacházejí v genomech organismů a tvoří více než polovinu celkové DNA. Jejich jedinečnost spočívá v tom, že se v haploidním genomu organismu vyskytují pouze jednou (Rosypal, 1998).

Zbývající část tvoří mnohonásobně se opakující nukleotidové sekvence (Alberts *et al.*, 1998). Tyto repetitivní sekvence DNA se dají rozdělit na dva typy, a to na rozptýlené a tandemové repetice.

U rozptýlených repetit se jednotlivé kopie vyskytují náhodně na různých místech haploidního genomu. Podle délky je můžeme rozlišit na krátké rozptýlené repetice, jejichž jednotky opakování jsou kratší než 300 bp, a na dlouhé rozptýlené repetice, jejichž jednotky opakování jsou delší než 300 bp (Rosypal, 1999).

U tandemových repetit (VNTRs – Variable number of tandem repeats) se určitá jednotka opakuje v tandemu, tj. bezprostředně za sebou (Rosypal, 1999).

### 3.2.1 Rozdělení tandemových repetit DNA

Do skupiny tandemových repetit se řadí satelity, minisatelity a mikrosatelity. Liší se délkou motivu, který tvoří repetici.

Satelity jsou sekvence DNA tvořené tandemovými repeticemi s nejdelším opakujícím se motivem, tj. více než stovka párů bází (Amour *et al.*, 1999).

Minisatelity jsou tvořeny základními jednotkami dlouhými desítky párů bází (10-100 bp) (Ellegren, 2004).

Nejmenší jednotku repetice mají mikrosatelity. Ta je tvořena jen několika páry bází (1-10 bp). V genomu se vyskytují častěji než minisatelity.

### 3.3 Mikrosatelitová DNA

Mikrosatelity jsou úseky DNA, které jsou složené z krátkých opakujících se jednotek o délce 1-10 párů bází (nejčastěji 2-6 bp). Jsou to jednoduché, tandemově se opakující úseky DNA. Používají se pro ně zkratky STRs (short tandem repeats), SSRs (simple sequence repeats) nebo VNTRs (variable number of tandem repeats). Samotný mikrosatelitový lokus obvykle nepřesahuje délku 100 bp.

Mikrosatelity se vyskytují jako náhodně rozptýlené opakující se části v eukaryontních genomech (Tautz, 1989; Weber, 1990).

Častěji se nacházejí v nekódujících sekvencích DNA kvůli poměrně vysoké mutační rychlosti v těchto oblastech. Předpokládá se, že většina mikrosatelitů je selektivně neutrální (Scribner & Pearce, 2000).

Mezi nejrozšířenější typy repetitivních jednotek patří dinukleotidová jednotka CA (méně AT, GA, nejméně GC), trinukleotidová CAC a tetranukleotidové motivy GATA a GACA. Nejfrekventovanější jsou dinukleotidové motivy, trinukleotidové repetice jsou nejvzácnější a vyskytují se nejméně (Weber & May, 1989).

### 3.3.1 Využití mikrosatelitů

Využití mikrosatelitů je velmi široké. Mikrosatelity se v genomu vyskytují velmi často, jsou vysoce polymorfní, a proto jsou používány jako genetické markery relativně malé velikosti, které mohou být jednoduše amplifikovány během PCR. Využívají se např. při studiu příbuzenských vztahů, pro detekci mimopárového oplození a při určování paternity, v rámci studia populační genetiky (např. genetická variabilita mezi populacemi), pro studium genového toku nebo migrace (Ellegren, 1992).

Použití mikrosatelitů je důležité nejen pro studium jedinců v populaci, ale také pro porovnání dvou a více populací mezi sebou, zejména z genetického hlediska. Vysoká mutační rychlost mikrosatelitových lokusů v porovnání s např. mitochondriální DNA je velmi užitečná pro stanovení rozdílů mezi blízce spřízněnými druhy nebo uvnitř druhů. Dále je tu možnost pro vypátrání kříženců a určení jejich druhového původu (Primmer *et al.*, 1996).

Jejich mutační rychlosti jsou velmi vysoké a díky tomu jsou mikrosatelity velmi polymorfní. To znamená, že se nacházejí v různých variantách v rámci jedné populace (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber & May, 1989). Různé varianty alel jsou snadno zjištělné v laboratoři technikou PCR použitím dvou oligonukleotidových primerů, které ohraničují mikrosatelitový lokus. Můžeme tak sledovat genetickou variabilitu mezi jedinci jednoho druhu, mezi jednotlivými druhy a dokonce v rámci populace (Amos & Pemberton, 1992).

#### 3.3.1.1 Analýza paternity a příbuznosti

Analýza paternity a příbuznosti pomáhá odhalit párovací strategie u různých druhů, reprodukční úspěšnost samců (Pemberton *et al.*, 1992; Coltman, 1999) a může poskytnout informace o monogamním párování.

Využití mikrosatelitové DNA pro zjištění paternity spočívá v určení konkrétních alel daného mikrosatelitového lokusu u všech potomků i u jejich potenciálních rodičů.

Analýzy paternity probíhají prostým srovnáním genotypů potomka a potenciálních rodičů. Zjišťujeme, zda potomci opravdu mají takové alely, které jsou některou z možných kombinací alel potenciálních rodičů.

### 3.3.1.2 PCR amplifikace DNA

PCR lze použít pro amplifikaci mikrosatelitové DNA. PCR je technika umožňující během relativně krátké doby mnohonásobně namnožit určitou sekvenci DNA ohraničenou primery z obou stran. PCR je zkratkou anglického Polymerase Chain Reaction neboli polymerázové řetězové reakce (Saiki *et al.*, 1985).

Dvojicí primerů se vymezi úsek DNA, který má být amplifikován. Velmi důležitou roli zde hraje speciální enzym - tepelně stabilní DNA polymeráza, která zabezpečuje syntézu nového komplementárního vlákna. Reakce probíhá v přístroji, tzv. termocykléru, který dodržuje zvolené teplotní hodnoty a časový průběh PCR reakce (Šmarda *et al.*, 2005).

### 3.3.2 Hledání mikrosatelitových lokusů

V dnešní době se pro získání mikrosatelitů používají dva základní postupy. První a zároveň preferovanější technikou je využití *cross-species* amplifikace. Druhý a finančně mnohem náročnější postup je navržení primerů *de novo*. Tento postup se používá tehdy, pokud nejsou dostupné mikrosatelity pro *cross-species* amplifikaci v dostatečném počtu nebo kvalitě.

### 3.3.3 *Cross-species* PCR amplifikace

Za posledních deset let se mikrosatelity staly jedněmi z nejběžněji používaných genetických markerů pro studium populací. Nicméně, jedním z primárních problémů, které omezují používání metody amplifikace mikrosatelitů je nedostatek univerzálních PCR primerů pro úspěšnou amplifikaci homologních produktů u širšího spektra druhů (Primmer *et al.*, 2005).

I když mikrosatelitové primery nemohou být obecně použity univerzálně, mezi blízkce příbuznými druhy je *cross-species* mikrosatelitová amplifikace uskutečnitelná (Primmer *et al.*, 2005).

Úspěšná *cross-species* amplifikace závisí na evoluční vzdálenosti mezi druhy, ze kterých byly mikrosatelitové lokusy izolovány (zdrojové druhy), a druhy, na které byly heterologní lokusy aplikovány (cílové druhy). Šance úspěšné *cross-species* amplifikace

sekvence DNA je proto nepřímo úměrná evoluční vzdálenosti mezi dvěma druhy. Tyto vztahy byly nejintenzivněji studovány právě u ptáků (Primmer *et al.*, 2005).

### 3.4 Problémy při analýze mikrosatelitů

Jedním z hlavních problémů při analýze mikrosatelitů je výskyt nulových alel. Tyto nulové alely se neamplifikují, a proto mohou svou přítomností negativně ovlivnit analýzu mikrosatelitové DNA. Zvláště nežádoucí je výskyt nulových alel při studiu mimopárových mládřat a mimopárové paternity. Pokud se zde nulové alely vyskytnou, je nebezpečí, že mládřata budou přiřazena nesprávným rodičům, a výsledky tak budou zkresleny (Dakin & Avise, 2004).

Například, pokud sledujeme výskyt mimopárových mládřat v populaci, může se stát, že některá mládřata zdánlivě nezdědila alelu od své homozygotní matky. Můžeme se potom mylně domnívat, že se jedná o vnitrodruhový hnízdni parazitizmus. Matka však ve skutečnosti nemusí být homozygotní, ale heterozygotní s jednou amplifikující se alelou a s jednou neamplifikující se alelou. Další možností je, že nositelem nulové alely bude homozygotní otec. V tomto případě je možné, že budou mládřata, která od něho zdědila nulovou alelu, označena jako výsledek mimopárové paternity (Dakin & Avise 2004).

Principem vzniku nulové alely je mutace DNA v místě, které je homologní k sekvenci primeru (obvykle v úseku blízkém 3'konci primeru), a tím znemožňuje proběhnutí PCR reakce (Dakin & Avise, 2004).

### 3.5 Mikrosatelity u brodivých (Ciconiiformes)

V řádu brodivých (Ciconiiformes) bylo provedeno několik studií za účelem objevení nových mikrosatelitových lokusů technikou *de novo*.

V čeledi volavkovití (Ardeidae) byly nalezeny mikrosatelity na následujících třech družích: kvakoš noční (*Nycticorax nycticorax*), volavka velká (*Ardea herodias*) a volavka žlutozobá (*Egretta eulophotes*). V čeledi čápoovití (Ciconiidae) byly technikou *de novo* objeveny nové mikrosatelitové lokusy u dvou druhů: čáp bílý (*Ciconia ciconia*) a nesyt lesní (*Mycteria americana*). Čeleď ibisovití (Threskiornithidae) je poslední z řádu brodivých, u jejíž zástupců byly nalezeny nové mikrosatelitové lokusy.

Konkrétně u čtyř druhů: ibis japonský (*Nipponia nippon*), ibis rudý (*Eudocimus ruber*), kolpík malý (*Platalea minor*) a kolpík růžový (*Ajaia ajaja*).

V případě volavky velké bylo navrženo 17 párů primerů, ze kterých se ukázalo být 15 lokusů polymorfních u volavky velké (McGuire & Noor, 2002). Všechny 17 párů primerů bylo pak úspěšných při *cross-species* amplifikaci v rámci čeledi na dalších třech druzích volavek: volavce bílé (*Ardea alba*), volavce popelavé (*Ardea cinerea*) a volavce jihoamerické (*Ardea cocoi*). Autoři ve svém článku publikují pouze zachycení PCR produktů *cross-species* amplifikace u těchto druhů, údaje o polymorfismu a počty alel u jednotlivých lokusů nejsou uvedeny.

V rámci studia mezidruhové *cross-species* PCR amplifikace Chang *et al.* (2005) testovali na druhu kvakoš noční osm mikrosatelitových lokusů odvozených z DNA volavky velké. Výsledky *cross-species* amplifikace ukázaly, že těchto 8 lokusů je u kvakoše nočního polymorfních, bylo nalezeno 2 až 13 alel na jednotlivých lokusech (Chang *et al.*, 2005). O čtyři roky později bylo u kvakoše nočního izolováno a popsáno 11 polymorfních mikrosatelitových markerů (Chang *et al.*, 2009).

Huang *et al.* (2009) objevili celkem 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů u volavky žlutozobé. Těchto 18 párů primerů dále testovali na dalších 5 druzích volavek – volavka stříbřitá (*Egretta garzetta*), volavka pobřežní (*Egretta sacra*), volavka bílá (*Ardea alba*), volavka čínská (*Ardeola bacchus*) a volavka rusohlavá (*Bubulcus ibis*). V článku autoři uvádějí pouze úspěšnost vzniku PCR produktů při *cross-species* amplifikaci u těchto pěti druhů. Údaje o polymorfismu a počtu alel na jednotlivých lokusech nejsou uvedeny.

Dalším vhodným druhem pro hledání mikrosatelitových lokusů a primerů *de novo* je nesyť lesní. Van den Busshe *et al.* (1999) publikovali 4 polymorfní mikrosatelity u tohoto druhu. O čtyři roky později detekovala Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) 11 nových lokusů. Dále byla vyzkoušena *cross-species* amplifikace mikrosatelitových lokusů u čápa bílého s použitím 6 párů primerů odvozených od nesýta amerického. Shephard *et al.* (2009) našli ve všech 6 případech polymorfní PCR produkty s počtem 2-3 alely u čápa bílého. Zároveň také u čápa bílého detekovali 7 polymorfních lokusů. O rok později bylo objeveno dalších 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Segelbacher, osobní sdělení).

V případě ibise japonského, který je kriticky ohroženým druhem, bylo nalezeno 8 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Ji *et al.*, 2004). Tyto lokusy byly dále testovány metodou *cross-species* amplifikace na blízkce příbuzném ibisu černohlavém



(*Threskiornis melanocephalus*), kdy bylo zjištěno, že pět z nich u tohoto druhu poskytuje rovněž polymorfni PCR produkty (Ji *et al.*, 2004). O dva roky později He *et al.* (2006) publikovali 11 nových polymorfni lokusů pro ibise japonského.

Lei *et al.* (2005) otestovali meziřádovou *cross-species* PCR amplifikací 22 párů mikrosatelitových primerů pocházejících z velmi vzdálených skupin živočichů: kapra obecného, tura domácího a kura domácího na 30 jedincích ibise japonského. V případě použití primerů odvozených od kapra obecného našli autoři u ibise japonského 2 polymorfni mikrosatelitové lokusy s počtem 2 alely. *Cross-species* amplifikace s použitím primerů pocházejících od tura domácího byly objeveny rovněž 2 polymorfni mikrosatelitové lokusy s počtem 2 alely a 7 alel.

Na jiném druhu ibise - ibis posvátný (*Threskiornis aethiopicus*) byly experimentálně vyzkoušeny dva páry primerů pocházející od tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*). *Cross-species* amplifikace poskytla polymorfni produkt pouze u jednoho páru primerů, kdy byl u ibise posvátného amplifikován mikrosatelitový lokus se 12 alelami (Wilson, 2008).

Pro ibise rudého bylo nalezeno metodou *de novo* 10 polymorfni mikrosatelitových lokusů (Santos *et al.*, 2006).

Yeung *et al.* (2008) publikovali 23 nově navržených polymorfni lokusů u kolpíka malého. Tyto nově objevené lokusy byly testovány na zástupcích druhů: kolpík růžový (*Ajaia ajaja*), ibis rudý (*Eudocimus ruber*), ibis posvátný (*Threskiornis aethiopicus*), kvakoš noční (*Nycticorax nycticorax*) a volavka bílá (*Ardea alba*). U těchto druhů autoři hodnotili pouze úspěšnost a neúspěšnost vzniku PCR produktů při *cross-species* amplifikaci. Z tohoto hlediska byl nejúspěšnějším druhem kolpík růžový, u kterého byly nalezeny amplikony na 16 lokusech.

U kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*) bylo detekováno 6 mikrosatelitů (Sawyer & Benjamin, 2006).

Dalším příkladem meziřádové *cross-species* amplifikace je článek Nádvorník *et al.* (2008), kdy byly použity mikrosatelitové lokusy ze zástupců řádu brodivých (volavka velká, nesyt americký a ibis nachový) a aplikovány na dva druhy plameňáků: plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) a plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*).

### 3.6. Mikrosatelity u plameňáků (Phoenicopteriformes)

Výzkum zaměřený na nalezení nových mikrosatelitových lokusů technikou *de novo* byl v řádu plameňáci (Phoenicopteriformes) proveden u dvou druhů plameňáků: plameňáka karibského (*Phoenicopus ruber*) a plameňáka růžového (*Phoenicopus roseus*).

Kapil (2005) objevil a ve své dizertační práci zveřejnil 6 polymorfních lokusů pro plameňáka karibského (*Phoenicopus ruber*). Tyto lokusy dále otestoval na třech blízké příbuzných druzích: plameňákovi růžovém, plameňákovi malém (*Phoenicopus minor*) a plameňákovi chilském (*Phoenicopus chilensis*). U všech druhů poskytla *cross-species* amplifikace polymorfní PCR produkty. Současně s ním našla Preston (2005) v rámci své dizertační práce další 4 polymorfní lokusy pro plameňáka karibského. Teprve Kapil *et al.* (2010) publikovali článek s ucelým souborem celkem 9 polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka karibského. Otestováno bylo šedesát jedinců plameňáka karibského, počet alel na jednotlivých lokusech se pohyboval od 3 do 14.

U plameňáka růžového bylo izolováno a popsáno 37 nových mikrosatelitových lokusů (Geraci *et al.*, 2010). Výzkum proběhl na souboru 24 až 30 mlád'at plameňáka růžového a počet alel se pohyboval v rozmezí 2-33 alel na jednotlivých lokusech.

*Cross-species* PCR amplifikaci na plameňáku karibském i plameňáku růžovém otestovali Nádvořník *et al.* (2008), kdy bylo pro amplifikaci použito 70 mikrosatelitových lokusů od zástupců řádu brodivých (volavka velká, nesyt americký a ibis nachový) a řádu veslonohých (kormorán velký a kormorán galapážský). Autoři z celkového otestovaného množství mikrosatelitů našli 7 polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového a 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka karibského.

### 3.7 Mikrosatelity u veslonohých (Pelecaniformes)

V řádu veslonož (Pelecaniformes) byly izolovány a popsány mikrosatelitové lokusy navržením párů primerů *de novo* u zástupců čeledí: kormoránovití, pelikánovití, terejovití a fregatkovití.

V rámci čeledi kormoránovití byly nalezeny mikrosatelity u 3 druhů: kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*) a kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*).

Duffie *et al.* (2008) prováděli výzkum na dvou populacích kormorána galapážského a objevili 8 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Fike *et al.* (2009) publikovali 24 polymorfních mikrosatelitových markerů u kormorána ušatého. O rok později bylo u kormorána ušatého objeveno dalších 8 nových mikrosatelitových lokusů (Mercer *et al.*, 2010). Těchto 8 nových lokusů autoři dále úspěšně použili při *cross-species* PCR amplifikací na dalších dvou druzích kormoránů: kormoránovi západním (*Phalacrocorax penicillatus*) a kormoránovi mořském (*Phalacrocorax pelagicus*).

U kormorána velkého bylo izolováno a popsáno 7 vysoce polymorfních mikrosatelitových markerů (Piertney *et al.*, 1998). Testování proběhla na 100 jedincích rozsáhlé populace a bylo zjištěno 9 až 44 alel na jednotlivých lokusech. Pro ověření, zda je těchto 7 nově objevených párů primerů vhodných i pro ostatní druhy řádu veslonohých, byly tyto primery dále testovány *cross-species* PCR amplifikací na kormoránu ušatém (*Phalacrocorax auritus*), kormoránu modrookém (*Phalacrocorax atriceps*) a kormoránu chocholatém (*Phalacrocorax aristotelis*). U všech těchto příbuzných druhů poskytla *cross-species* amplifikace polymorfní mikrosatelity s počtem 2-12 alel na lokus.

V čeledi pelikánovití byly zjištěny polymorfní mikrosatelitové lokusy u následujících druhů: pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikán severoamerický (*Pelecanus erythrorhynchos*).

U pelikána bílého bylo izolováno 10 mikrosatelitových lokusů (de Ponte Machado *et al.*, 2009). *Cross-species* PCR amplifikace těchto lokusů byla úspěšná u dalších druhů pelikánů: pelikána hnědého (*Pelecanus occidentalis*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*) a pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) (de Ponte Machado *et al.*, 2009). Hickman *et al.* (2009) nově našli a popsali 9 mikrosatelitových lokusů u pelikána severoamerického.

Fregatka malá (*Fregata minor*) je jediným zástupcem čeledi fregatkovití, na kterém proběhl výzkum za účelem nalezení nových polymorfních mikrosatelitových lokusů. Dearborn *et al.* (2008) provedli výzkum na 23 jedincích havajské populace fregatky malé a objevili 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Poslední čeledí jsou terejovití, kde se uskutečnil výzkum polymorfních lokusů na družích: terej modronohý (*Sula nebouxii*), terej červenonohý (*Sula sula*) a terej guánový (*Sula variegata*).

Faircloth *et al.* (2009) objevili u tereje modronohého (*Sula nebouxii*) 11 polymorfních mikrosatelitových DNA lokusů. O rok později bylo testováno dalších 24 jedinců tereje modronohého a bylo izolováno a popsáno dalších 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Taylor *et al.*, 2010). Pomocí těchto 10 lokusů autoři dále otestovali *cross-species* amplifikaci u příbuzného druhu tereje žltonohého (*Sula leucogaster*), u kterého našli 3 polymorfní mikrosatelitové lokusy s počtem 3 až 5 alel.

Morris-Pocock *et al.* (2010) objevili 15 nových polymorfních mikrosatelitových lokusů u tereje červenonohého (*Sula sula*). Tento finální set 15 polymorfních lokusů dále použili pro *cross-species* PCR amplifikaci u tereje modronohého (*Sula nebouxii*) a tereje guánového (*Sula variegata*). 4 polymorfní mikrosatelitové lokusy s počtem 2-5 našli u tereje modronohého a 5 polymorfních mikrosatelitových lokusů s počtem 2-6 alel v případě tereje guánového.

Posledním testovaným terejem je terej guánový (*Sula variegata*), u kterého Taylor *et al.* (2010) izolovali a popsali 10 mikrosatelitových lokusů. I tyto lokusy autoři dále úspěšně použili pro *cross-species* amplifikaci u příbuzného druhu terej žltonohý, u kterého objevili 7 polymorfních mikrosatelitových lokusů se 3 až 8 alelami.

### 3.8 Mikrosatelity u potápek a potáplic

Potápky (Podicipediformes) a potáplice (Gaviiformes) jsou řády příbuzné třem předchozím řádům. Jedná se také o velké vodní ptáky.

U potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*) Sachs & Hughes (1999) objevili a popsali 7 polymorfních mikrosatelitových lokusů, počet alel se pohyboval mezi 8 až 18 alelami. Tyto nově nalezené lokusy byly dále použity pro *cross-species* amplifikaci na 5 družích severoamerických potápek: potápka černokrká (*Podiceps nigricollis*), potápka žlutorohá (*Podiceps auritus*), potápka americká (*Podilymbus podiceps*), potápka západní (*Aechmophorus occidentalis*), potápka Clarkova (*Aechmophorus clarkii*) a na jedné hybridní formě: hybrid *occidentalis/clarkii*. *Cross-species* amplifikace poskytla polymorfní PCR produkty u všech 6 lokusů pouze u potápky žlutorohé.

Celkem 7 polymorfních mikrosatelitových DNA lokusů bylo izolováno u potáplice lední (*Gavia immer*). Výzkum proběhl na 83 jedincích pocházejících z 10 různých lokalit v Severní Americe (McMillan *et al.*, 2004). Tyto nově nalezené mikrosatelitové lokusy zatím nebyly dále využity pro *cross-species* PCR amplifikaci.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Pro tuto práci byla použita DNA vyizolovaná z krevních vzorků osmi jedinců volavčíka člunozobého (*Cochlearius cochlearius*) z chovu ZOO Dvůr Králové nad Labem. Část chovné skupiny pocházela z různých evropských ZOO (ZOO Beauval, ZOO Frankfurt), proto nebyly k dispozici konkrétní informace o příbuznosti jedinců. Jedinou informací, již z chovu ZOO Dvůr Králové nad Labem, bylo, že mezi testovanými jedinci se nachází matka se třemi mládřaty. Otec mládřat není známý, nebyl k dispozici vzorek jeho DNA.

Krev byla odebírána v ZOO pod dohledem veterinárního lékaře při přehánění ptáků ze zimních voliér do letních (popř. naopak) sterilní injekční jehlou z žíly na běháku.

### 4.2 Izolace DNA

- 1) Do mikrozkušavky napipetovat 100  $\mu$ l roztoku krve v Queen's pufru.
- 2) Připipetovat 100  $\mu$ l roztoku proteinázy K (10 mg/ml), promíchat a přidat 100  $\mu$ l 10% roztoku SDS.
- 3) Mikrozkušavky inkubovat přes noc v termostatu při teplotě 37 C.
- 4) Ke směsi přidat 300  $\mu$ l fenolu a 300  $\mu$ l chloroformu, mikrozkušavku vortexovat a zcentrifugovat (2 000 g/5 min). Po centrifugaci vrchní fázi odebrat do nové zkušavky tak, aby nedošlo k nasátí vláken DNA se zbytky fenolu a chloroformu.
- 5) K odebranému roztoku přidat 600  $\mu$ l chloroformu, mikrozkušavku vortexovat a centrifugovat (2 000 g/5 min). Po centrifugaci vrchní fázi odebrat do nové mikrozkušavky tak, aby nedošlo k nasátí bílého zákalu proteinů z mezifáze. Krok 5) ještě jednou zopakovat.
- 6) K odebranému roztoku přidat 180  $\mu$ l vychlazeného octanu sodného o koncentraci 3 mol/l a mikrozkušavku vyplnit vychlazeným isopropanolem. Promíchat a uložit na 2 hodiny do  $-20$  °C.
- 7) Mikrozkušavky centrifugovat 30 až 40 minut při 13 000 g/min.
- 8) Isopropanol slít a ke sraženině DNA napipetovat 1 ml vychlazeného 70% ethanolu.
- 9) Mikrozkušavky centrifugovat 10 minut při 13 000 g/min.

- 10) Ethanol slít a zbylou sraženinu DNA v mikrozkuhavce vysušit v termobloku nebo v koncentrátoru DNA.
- 11) K vysušené DNA připipetovat 500  $\mu$ l TE pufru.
- 12) Rozpouštět přes noc v termostatu při 40 °C.
- 13) Po fluorometrickém stanovení koncentrace roztok DNA v mikrozkuhavce zamrazit v – 20 °C.

### 4.3 PCR amplifikace DNA

Složení PCR mixu pro 6 vzorků (včetně započítaných ztrát při pipetování):

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

Mikrozkuhavku po napipetování všech složek zvortexovat a krátce zcentrifugovat. Každá reakce sestává z 9  $\mu$ l PCR mixu a 1  $\mu$ l roztoku DNA o koncentraci 50  $\mu$ g/ml.

Základní časový a teplotní profil PCR reakce:

1.	94°C	5 min	} 35 cyklů
2.	94°C	30 s	
	50°C	30 s	
	72°C	30 s	
3.	72°C	7 min	

Výše popsanou technikou PCR amplifikace bylo u volavčíka člunozobého otestováno všech 340 párů primerů. Tyto primery pocházely z různých zdrojových druhů, kteří jsou dále uvedeni v Tabulce č.1.



**Tabulka č.1:** Zdrojové druhy testovaných primerů

V jednotlivých sloupcích jsou uvedeny řády, ze kterých zdrojové druhy pocházejí; druhy, u kterých byl mikrosatelitový lokus objeven, a název popsaného mikrosatelitového lokusu.

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 (Selenbacher, osobní sdělení, 2009)
	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> , 2008)
	Kolpík růžový ( <i>Ajaia ajaja</i> )	Aaju1, Aaju2, Aaju3, Aaju4, Aaju5, Aaju6 (Sawyer & 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> )	WS1, WS2, WS4, WS6 (Van den Busshe <i>et al.</i> , 1999); WS $\mu$ 03, WS $\mu$ 08, WS $\mu$ 09, WS $\mu$ 13, WS $\mu$ 14, WS $\mu$ 17, WS $\mu$ 18, WS $\mu$ 19, WS $\mu$ 20, WS $\mu$ 23, WS $\mu$ 24 (Tomasulo-Seccomandi <i>et al.</i> , 2003)
	Volavka velká ( <i>Ardea herodias</i> )	Ah 205, Ah 208, Ah 209, Ah 210, Ah 211, Ah 212, Ah 217, Ah 320, Ah 341, Ah 343, Ah 414, Ah 421, Ah 517, Ah 522, Ah 526, Ah 536, Ah 630 (McGuire & 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)
Plameňáci	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopterus ruber</i> )	Pru $\mu$ 1, Pru $\mu$ 2, Pru $\mu$ 3, Pru $\mu$ 4, Pru $\mu$ 5, Pru $\mu$ 6, Pru $\mu$ 7, Pru $\mu$ 8, Pru $\mu$ 9, Pru $\mu$ 13 (Kapil, 2005; Preston, 2005; Kapil <i>et al.</i> , 2010)
	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)

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus
Potápky	Potápka rudokrká ( <i>Podiceps grisegena</i> )	PgAAT1, PgAAT3, PgAAT6, PgAAT8, PgAAT25, PgAAT34, PgAAT41 (Sachs & Hughes, 1999)
Potáplice	Potáplice lední ( <i>Gavia immer</i> )	GimA12; GimC5, GimD12, GimE11, GimD9, GimC11, GimA9 (McMillan <i>et al.</i> , 2004)
Veslonozi	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> )	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); 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> )	PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 07, PeEr 08, PeEr 09 (Hickman <i>et al.</i> , 2009)
	Fregatka malá ( <i>Fregata minor</i> )	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin18 (Dearborn <i>et al.</i> , 2008)
	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); Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2A- 36, Sn2B-100 (Taylor <i>et al.</i> , 2010)
	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> , 2010)
Vrubozobí	Kachna divoká ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	APH07, APH08, APH09, APH12, APH13, APH16 (Maak <i>et al.</i> , 2003)
	Kachna pižmová ( <i>Cairina moschata</i> )	CmAAT16, CmAAT35, CmAAT38 (Stai & Hughes, 2003)

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus
Vrubozobí	Kachnice laločnatá ( <i>Biziura lobata</i> )	Blm1, Blm10, Blm12 (Guay & Mulder, 2005)
	Kajka mořská ( <i>Somateria mollissima</i> )	Smo10 (Paulus & Tiedemann, 2003)
Tučňáci	Tučňák kroužkový ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	AM13 (Roeder <i>et al.</i> , 2001)
Dlouhokřídlí	Alkounek drobný ( <i>Aethia pygmaea</i> )	Apy06, Apy07 (Dawson <i>et al.</i> , 2005)
Sudokopytníci	Pratur indický, zebu ( <i>Bos indicus</i> )	HEL1 (Sodhi <i>et al.</i> , 2006)

#### 4.4 Elektroforéza DNA a analýza gelů

Produkty získané PCR reakcí byly separovány pomocí vertikální elektroforézy v 6% polyakrylamidovém gelu. Postup je optimalizován pro použití vyhřívané vertikální sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 333 x 392 mm a 333 x 418 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

- 1) Větší sklo omýt vodou a vydrhnout kartáčkem. Opláchnout deionizovanou vodou, osušit, omýt 96% ethanolem. Ošetřit na ploše, která se bude dotýkat gelu, přípravkem na odpuzování vody na skla automobilů.
- 2) Kratší sklo omýt vodou se saponátem a vydrhnout kartáčkem. Na ploše, která se bude dotýkat gelu, ošetřit 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu s 3 µl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Ten nechat 5 minut zaschnout, poté opláchnout 96% ethanolem.
- 3) Na rovnou podložku v digestoři umístit větší sklo ošetřenou plochou nahoru, na něj po stranách položit 0,4 mm silné spacery a na ně položit menší sklo ošetřenou plochou dolů. Skla na každé straně sepnout klipsy v místě spacerů.
- 4) Připravit roztok 6% polyakrylamidového gelu. Roztok dobře promíchat a pomalu vypouštět mezi skla.
- 5) Po vyplnění celého prostoru mezi skly gelem, vsunout mezi skla v místě, kde se plnil tento prostor gelem, hřebínek jeho rovnou stranou asi 0,7 až 1 cm hluboko. V místě hřebínku skla sepnout klipsy a gel nechat hodinu polymerizovat.
- 6) Po utužení gelu skla omýt od všech zbytků polyakrylamidu. Sklo osušit a upevnit pomocí šroubovacích úchyťů do elektroforetické komůrky.

- 7) Katodový i anodový prostor zalít 0,5 x TBE pufrem, vytáhnou hřebínek a vzniklou mezeru mezi skly dobře vyčistit proudem pufru z injekční stříkačky. Katodový i anodový prostor uzavřít, nastavit hodnotu výkonu 90 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA). Za těchto podmínek nechat gel předeřhřát asi 30 minut.
- 8) Pět minut před nanesením vzorků tyto vzorky vzniklé smísením 1 objemového dílu PCR produktu a 0,5 dílu nanášecího pufru vložit na 3 minuty do denaturačních podmínek (termocycler, 94°C). Po vyjmutí mikrozkuřavky z termocycleru vzorky okamžitě vsunout do ledové tříště, aby se zabránilo renaturaci denaturovaných vláken DNA produktů.
- 9) Během denaturace do vyčištěné mezery mezi skly vsunout hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu.
- 10) Do mezer mezi zoubky hřebínku nanést po 2 µl jednotlivých vzorků pipetou. Po napipetování všech vzorků katodový prostor uzavřít, nasadit elektrodu a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jako limitní faktor nastavit hodnotu výkonu 70 W.
- 11) Čas separace vzorků závisí na molekulárních hmotnostech (délkách) rozdělovaných PCR produktů. Orientačně je možné se řídit pomocí barviv v nanášecím pufru (bromfenolová a xylenová modř), které ukazují průběh elektroforézy. Obvyklá doba separace vzorků je 1 až 3 hodiny.
- 12) Po uplynutí času elektroforetického dělení vzorků gel se skly vyjmout a položit do vodorovné polohy menším sklem nahoru. Z prostoru mezi skly opatrně vytáhnout hřebínek i oba spacery a skla od sebe odpáčit čepelí nože.
- 13) Odchlípené menší sklo s přilepeným gelem otočit gelem nahoru a uložit do fotomisky, umístit na třepačku a zalít fix/stop roztokem. Doba působení fix/stop roztoku na gel je přibližně 20 minut.
- 14) Fix/stop roztok slít do baňky a sklo s gelem promýt v deionizované vodě. Pak následuje 5 minutové promytí gelu na třepačce v 1% roztoku HNO<sub>3</sub>, vylití tohoto roztoku a promytí gelu v deionizované vodě.
- 15) Sklo s gelem umístit na třepačku do 0,1% roztoku AgNO<sub>3</sub> a nechat působit přibližně 30 minut. Poté roztok slít zpět do zásobní láhve.
- 16) Sklo s gelem na 5 vteřin ponořit do misky s deionizovanou vodou. Přemístit do fotomisky na třepačku a zalít vývojkou. Sleduje se vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů.
- 17) Vyvíjení zbarvení zastavit přilítím fix/stop roztoku uchovaného z kroku 14).

18) Sklo s gelem potom ponořit asi na 2 minuty do deionizované vody, pak přenést na 1 hodinu do sušárny, kde se gel při 60 °C vysuší. Po vysušení je možné sklo vyhodnotit na negatoskopu. K záznamu výsledků na skle je vhodné použít scanner nebo digitální fotoaparát.

19) Sklo s již nepotřebným gelem ponořit na několik desítek minut až několik hodin do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l. Gel by se měl kompletně odlepit a pokud ne, lze jej ze skla strhnout pomocí škrabky. Sklo se umyje a je znovu k použití.

## 4.5 Chemikálie

Akrylamid (Serva)

*aTaq* DNA polymeráza (5U/μl), M1241 (Promega)

Bromfenolová modř (Serva)

Deionizovaná voda

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

Dusičnan stříbrný (Lachema)

Ethanol – 96% roztok (Seliko Olomouc)

Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na<sub>2</sub>EDTA) (Lachema)

Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Lachema)

Formaldehyd (AppliChem)

Formamid (AppliChem)

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 Roztoky

Fix/stop roztok:

80 ml ledové kyseliny octové

objem doplnit deionizovanou H<sub>2</sub>O na 800 ml

Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

0,125 g bromphenolové modře

0,125 g xylénové modře

10 ml H<sub>2</sub>O

100 ml formamidu

Polyakrylamidový 6% gel:

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

40 µl N, N, N', N'- tetramethylethylendiaminu

Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného AgNO<sub>3</sub>:

0,8 g AgNO<sub>3</sub>

objem doplnit deionizovanou H<sub>2</sub>O na 800 ml

před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Roztok 1% kyseliny dusičné HNO<sub>3</sub>:

12 ml 65% HNO<sub>3</sub>

objem doplnit deionizovanou H<sub>2</sub>O na 800 ml

Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:

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

3 µl 3- methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Roztok 10% peroxodisíranu amonného (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>:

1 g peroxodisíranu amonného (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

rozpustit v 10 ml deionizované H<sub>2</sub>O

Vývojka:

24 g uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

objem doplnit deionizovanou H<sub>2</sub>O na 800 ml

uložit ve 4 °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>

Zásobní roztok 6% akrylamidu:

420 g močoviny

484 ml deionizované H<sub>2</sub>O

50 ml 10 x TBE

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

po rozpuštění všech složek zfiltrvat a uložit v temné láhvi ve 4 °C

#### 4.7 Přístrojové vybavení

- váhy: EK – 200g (AND)
- elektroforetický zdroj: EV232 (Consort)  
ECPS 3000/150 (Pharmacia Fine  
Chemicals)
- chladnička kombinovaná: (Whirpool)
- magnetická míchačka: RCTbasic (Ika)
- mikropipety: Nichipipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)  
Finnpipette, 0,3-3 µl, 1-10 µl, 10-100 µl  
(ThermoLabsystems)
- minicentrifuga: E-contrifuge (Wealtec)
- minicentrifuga: Spectrafuge Mini (Labnet)
- negatoskop: NEGA1 (Maneko)
- sekvenační elektroforetická komůrka: S2 (Whatman Biometra)
- sušárna: HS 122S (Chirana)
- temperovaný blok: Dri-block DB-2D (Techne)
- termocykler: TC-XP cycler (2 bloky po 48 x 0,2 ml)  
(Bioer Technology)

- třepačka: Orbit 1 900 (Labnet International)
- vortex: MS2 Minishaker (IKA)
- výrobník deionizované vody: AquaOsmotic
- výrobník ledu: Icematic F100 Compact (Castel Mac)



## **5. Výsledky**















































## **6. Diskuse**













## 7. Závěr

V této práci jsem provedla testování 340 párů primerů metodou *cross-species* PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitových lokusů u volavčíka člunozobého (*Cochlearius cochlearius*). Tyto páry primerů pocházely z osmi různých řádů ptáků a jednoho řádu savců, u kterých vykazovaly polymorfismus.

Testování probíhalo nejprve na 6 jedincích daného druhu, na kterých proběhly primární testy všech 340 párů primerů. U polymorfních mikrosatelitových lokusů jsem následně provedla optimalizaci podmínek teplot annealingu ( $T_a$ ), počet cyklů při PCR a délky elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu.

Po zjištění optimálních podmínek pro vizualizaci polymorfních mikrosatelitových lokusů jsem pokračovala ve zjišťování genotypů. Pro genotypyzaci jsem použila vyizolovanou DNA z 8 jedinců volavčíka člunozobého z chovu ZOO Dvůr Králové nad Labem.

Na základě provedených testů jsem zjistila celkem 34 polymorfních mikrosatelitových lokusů, které se u volavčíka člunozobého úspěšně amplifikovaly. Úspěšnost záchytu polymorfních mikrosatelitů byla 10 %.

Tyto lokusy je možné využít při studiu paternity volavčíka člunozobého (*Cochlearius cochlearius*).

I přes malý počet jedinců ve zkoumané skupině se podařilo díky programu CERVUS 3.0.3 zjistit některé statistické parametry mikrosatelitových lokusů.

## 8. Seznam použité literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (1998): *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem.
- Amour, J.A.L., Alegre, S.A., Miles, S., Williams, L.J. & Badge, R.M. (1999): *Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA*. Oxford University Press. New York.
- Amos, B. & Pemberton, J. (1992). DNA fingerprinting in non-human populations. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2, 857–860.
- Burnie, D. (2002): *Zvíře*. Knižní klub, Praha.
- Coltman, D. W. (1999). Male reproductive success in a promiscuous mammal: behavioural estimates compared with genetic paternity. *Molecular Ecology*, 8, 1199-1209.
- Dakin, E.E. & Avise, J.C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504–509.
- Dawson, D.A., Hunter, F.M., Pandhal, J., Buckland, R., Parham, A., Jones I.L., Bradshaw, M., Jehle, R. & Burke, T. (2005): Assessment of 17 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5-15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes*, 5, 289-297.
- de Ponte Machado, M., Feldheim, 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. *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*. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona.
- Dimitrijevič, J. (1991): *Ptáci – známí, neznámí, lovení, chránění*. Lidové nakladatelství, Praha.
- Roeder, A.D., Marshall, R.K., Mitchelson, A.J., Visagathilagar, V., Ritchie, P.A., Love, D.R., Pakai, T.J., McPartlan, H.C., Murray, N.D., Robinson, N.A. Kerry, K.R. & Lambert, D.M. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10, 1645–1656.

- Duffie, C., Glenn, T.C., Hagen, C. & Parker, P. (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 625-627.
- Ellegren, H. (1992): Polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of microsatellites – a new approach to studies of genetic relationships in birds. *The Auk*, 109, 886-895.
- Faircloth, B.C., Ramos, A., Drummond, H. & Gowaty, P.A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *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, 1138-1185.
- Flegr, J. (2005): *Evoluční biologie*. 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.
- He, L.-P., Wan, Q.-H., Fang, S.-G. & Xi, Y.-M. (2006): Development of novel microsatellite loci and assesment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics*, 7, 157-160.
- Hickman, C.R., Peters, M.B., Crawford, N.G., Hagen, C., Glenn, T.C. & Somers, C.M. (2009): Development and characterization of microsatellite loci on the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1439-1441.
- Hofrichterová, A. (2008): *Ročenka Unie českých a slovenských zoologických zahrad*. Praha.
- Huang, X., Zhou, X., Chen, M., Fang, W. & Chen, X. (2009): Isolation of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics*. Online First.
- Hudec, K. *et al.* (1994): *Fauna ČR a SR - Ptáci 1*. Academia, Praha.
- Chang, Q., Cao, F.-H., Zhu, L.-F., Zhang, B.-W. & Zhou, K.-Y. (2005): Microsatellite and genetic diversity in black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* in the lower reaches of Yangtze River. *Acta Zoologica Sinica*, 51, 657-663.
- Chang, Q., Xie, Z., Li, Q. & Zhou, K. (2009): Microsatellite loci developed for black-crowned night heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservation Genetics*, 10, 1537-1539.
- Chapuis, M.-P. & Estoup, A. (2007): Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621-631.

- Chistiakov, D.A., Hellemans, B. & Volckaert, F.A.M. (2005): Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics, *Aquaculture*, 255, 1-3.
- Goldstein, D.B. & Schlötterer, C. (1999): Microsatellites, Evolution and Applications. *Heredity*, 83, 633-635.
- Gosler, A. (1994): Atlas ptáků světa. Příroda, Bratislava.
- Guay, P.-J. & Mulder, 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.
- Ji, Y.-J., Liu, Y.-D., Ding, C.-Q. & Zhang, D.-X. (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes*, 4, 615-617.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. (2007): Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099-1106.
- Kapil, R. (2005): Microsatellite-based genetic profilings for the management of wild and captive flamenco populations. Dizertační práce, University of North Texas.
- Kapil, R., Sawyer, G.M., Preston, L. & Benjamin, R.C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber*). *Molecular Ecology Resources*. Preprint.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T. & Nevo, E. (2004): Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 991–1007.
- Litt, M. & Luty, J.A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44, 397-401.
- 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.
- 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. & Mullis, T.D. (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources*. Online First.



- 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.
- Nádvorník, P., Drobek, A. & Čihák, K. (2008): Microsatellite markers for the study of paternity in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*) and Caribbean Flamingo (*P. ruber*). Journal of Agrobiology, 25, 93-96.
- 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.
- Pemberton, J. M., Albon, S. D., Guinness, F. E., Clutton-Brock, T. H. & Dover, G. A. (1992). Behavioural estimates of male mating success tested by DNA fingerprinting in a polygynous mammal. Behavioral Ecology, 3, 66-75.
- Piertney, S.B., Goostrey, A., Dallas, J.F. & Carss, D.N. (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. Molecular Ecology, 7, 138-140.
- Pivoňka, P. (2005): Volavčik člunozobý (*Cochlearius cochlearius*)  
<http://www.biolib.cz/cz/image/id6554/> (7.3.2010)
- 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.
- 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.
- Rosypal, S. a kol. (2003): Nový přehled biologie. Scientia, Praha.
- Rosypal, S. (1999) Úvod do molekulární biologie, Druhý díl – Molekulární biologie eukaryot. Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno.
- Sachs, J.L. & Hughes, C.R. (1999): Characterization of microsatellite loci for red-necked grebes *Podiceps grisegena*. Molecular Ecology, 8, 687-688.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erich, H.A. (1985): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-791
- Santos, M.S., Gonçalves, 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.
- Scribner, K.T. & Pearce, J.M. (2000): Microsatellites: Evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. *Molecular methods in ecology*, Chapter 10, Blackwell Science, Oxford.
- Shephard, J.M., Galbusera, P., Hellemans, B., Jusic, A. & Akhandaf, J. (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics*, 10, 1525-1528.
- Sodhi, M., Mukesh, M., Prakash, B., Ahlawat, S.P.S. & Sobti, R.C. (2006): Microsatellite DNA typing for assessment of genetic variability in Tharparkar breed of Indian zebu (*Bos indicus*) cattle, a major breed of Rajasthan. *Journal of Genetics*, 85, 165-170.
- Stai, S.M & Hughes, C.R. (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics*, 34, 384-397.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantíček, R., Růžičková, V. and Kostíková, J. (2005): *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, 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. (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxi*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology*, 151, 525-528.
- Tautz, D. (1989): Hypervariable simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17, 6463-6471.
- Tomasulo-Seccomandi, A.M., Schable, N.A., Bryan, A.L. jr., Brisbin, I.L. Jr, del Lama, S.N. & Glenn, T.C. (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 563-566.
- Van den Busshe, R.A., Harmon, S.A., Baker, R.J., Bryan, A.L. Jr., Rodgers, J.A. jr., Harris, M.J. & Brisbin, I.L. (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the Wood Stork (*Mycteria americana*). *The Auk*, 116, 1083-1092.
- Weber, J. L. (1990): Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> polymorphism. *Genomics* 7, 524-530.
- Weber, J.L. & May, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain-reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44, 388-396.
- Wilson, R. (2008): Sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) – Modern samples. Summer Studentship 2007/2008. Published online ([awcmee.massey.ac.nz](http://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.

<http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id21084/> (2.2.09)

## **9. Seznam použitých zkratk a symbolů**

BFM – bromfenolová modř

bp – páry bází

DNA – kyselina deoxyribonukleová

dNTPs – směs deoxynukleotid-trifosfátů

GenBank – databáze nukleotidových sekvencí

PCR – polymerázová řetězová reakce

ssDNA – jednovláknová DNA

SSLP – délkový polymorfismus jednoduchých sekvencí

SSRs – repetice jednoduchých sekvencí

STRs – krátké tandemové repetice

$T_a$  – teplota annealingu

$t_e$  – čas elektroforetické separace