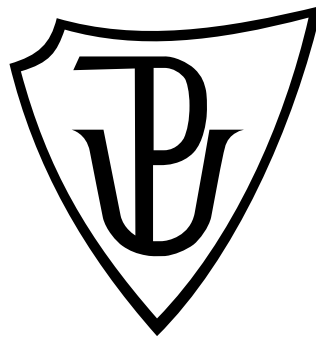


Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



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

Diplomová práce

Jana Vrbatová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

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

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

V Olomouci dne

.....

Chtěla bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho odborné rady, poskytnuté materiály, ochotu a jeho čas, který mi věnoval při vypracování této diplomové práce.

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů u ibise rudého (*Eudocimus ruber*), které by byly vhodné pro stanovení a ověření genetických vztahů u tohoto druhu.

Teoretická část této diplomové práce se nejprve věnuje podrobnějšímu popisu ibise rudého a jeho zařazení do systému, dále se zabývá obecnou charakteristikou mikrosatelitových lokusů, jejich vlastnostmi a jejich mutačními procesy a především se věnuje popisu polymorfních mikrosatelitů izolovaných z DNA druhů patřících do řádu brodivých (Ciconiiformes).

Pro hledání polymorfních mikrosatelitů jsem použila metodu založenou na PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů s *cross-species* primery, které byly odvozeny z DNA taxonomicky příbuzných druhů z řádu brodivých (Ciconiiformes), ale i z DNA druhů patřících do evolučně vzdálenějších řádů dlouhokřídlých (Charadriiformes), potápek (Podicipediformes), potáplic (Gaviiformes), sudokopytníků (Artiodactyla), tučňáků (Sphenisciformes) a vrubozobých (Anseriformes).

Analýzou 174 mikrosatelitových lokusů z devatenácti zdrojových druhů, které jsem testovala na 6 jedincích, jsem našla 17 polymorfních lokusů. Z těchto 17 polymorfních mikrosatelitů jsem vybrala 9 nejpolymorfnějších, které jsem použila pro vygenotypování 27 jedinců ibisů rudých. Zpracováním získaných genotypových dat těchto 9 mikrosatelitů v programu Cervus 3.0.3 jsem získala jejich charakteristiky a vybrala tak 4 mikrosatelity, které byly nejvhodnější pro paternitní analýzy a na jejich základě jsem se snažila ověřit příbuzenské vztahy u ibisů rudých z chovné skupiny ze ZOO Dvůr Králové nad Labem.

Summary

This master thesis dealt with finding polymorphic microsatellite loci for scarlet ibis (*Eudocimus ruber*), which would be suitable for the determination and validation of genetic relationships of this species.

The theoretical part of this master thesis deals firstly with a detailed description of the scarlet ibis and its taxonomy, discusses the general characteristics of microsatellite loci, their properties and their mutational processes and mainly deals with the description of polymorphic microsatellite DNA isolated from species belonging to the order of Ciconiiformes.

To search for polymorphic microsatellites I used a method based on PCR amplification of microsatellite loci in a cross-species primers that were derived from DNA taxonomically related species of the order of Ciconiiformes, but also the DNA of species belonging to the evolutionarily distant orders Charadriiformes, Podicipediformes, Gaviiformes, Artiodactyla, Sphenisciformes and Anseriformes.

Analysis of 174 microsatellite loci from the 19 source species, which I tested in 6 individuals, I found 17 polymorphic loci. Of these 17 polymorphic microsatellite I chose 9 the most polymorphic that I used for genotyping 27 individuals of the scarlet ibises. Processing obtained genotype data of these 9 microsatellites in the program Cervus 3.0.3 I got their characteristics and chose four microsatellites, which are the most suitable for paternity analysis and I tried to verify family relationships the scarlet ibises from breeding group of Dvůr Králové nad Labem.

Obsah

1 Úvod	6
2 Cíle práce	7
3 Literární přehled	8
3.1 Řád brodiví (Ciconiiformes)	8
3.1.1 Alternativní pojetí řádu brodivých	9
3.1.2 Čeleď ibisovití (Threskiornithidae)	9
3.1.3 Charakteristika ibise rudého (<i>Eudocimus ruber</i>) a zařazení do systému	10
3.1.3.1 Mikrosatelity popsané u ibise rudého	11
3.2 Mikrosatelity v řádu brodivých	13
3.2.1 Mikrosatelity v čeledi čápovitých	13
3.2.2 Mikrosatelity v čeledi ibisovitých	14
3.2.3 Mikrosatelity v čeledi volavkovitých	15
3.3 Repetitivní sekvence DNA	16
3.3.1 Mikrosatelity	16
3.3.1.1 Vlastnosti mikrosatelitů	17
3.3.1.2 Mutace mikrosatelitových lokusů	17
3.3.1.3 Mutační modely	18
3.3.2 Homoplazie mikrosatelitů	19
3.3.3 Nulové alely	19
3.3.4 Princip hledání nových mikrosatelitových lokusů	20
3.4 Mikrosatelity v ptačím genomu	21
3.4.1 Použití mikrosatelitů v ornitologii	21
3.5 PCR – polymerázová řetězová reakce	22
3.5.1 Princip PCR	22
3.6 Partnerské vztahy u ptáků	23
3.6.1 Mimopárové rodičovství	23
4 Materiál a metody	25
4.1. Biologický materiál	25
4.2. Izolace DNA z krve ibise rudého	25
4.3 PCR amplifikace DNA	26
4.4 Zpracování PCR produktů	28
4.5 Použité chemikálie	30
4.6 Použité roztoky	31
4.7 Laboratorní přístroje	33
5 Výsledky	34
6 Diskuze	42
7 Závěr	47
8 Seznam zkratk	48
9 Použitá literatura	49

1 Úvod

Mikrosatelity jsou díky svým polymorfním vlastnostem a četnému výskytu v genomu velmi vhodné genetické markery pro řadu výzkumných účelů, především pak pro studium populací a určení genetických vztahů v těchto populacích. Pro studium příbuzenských vztahů a paternity se využívá metoda založená na PCR amplifikaci mikrosatelitové DNA, kdy se výsledné PCR produkty rozdělí pomocí elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu a následně se vizualizují dusičnanem stříbrným.

V této práci budu hledat polymorfní mikrosatelity pro determinaci paternity u ibise rudého (*Eudocimus ruber*), a tím budu navazovat na svou bakalářskou práci. V rámci své bakalářské práce jsem se věnovala analýze mikrosatelitů, které měly být vhodné pro paternitní studie u ibise rudého, avšak moje výsledky tomu neodpovídaly, protože jsem pomocí těchto mikrosatelitů nebyla schopna určit u ibise rudého příbuzenské vztahy. Proto v této diplomové práci budu hledat další polymorfní mikrosatelity, pomocí *cross-species* primerů navržených pro taxonomicky příbuzné druhy, které by byly vhodné pro ověřování a určování příbuzenských vztahů a paternity u ibise rudého.

2 Cíle práce

- Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
- Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
- PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů s využitím *cross-species* primerů, které jsou známe od taxonomicky příbuzných druhů ptáků, za účelem zjištění jejich polymorfismu u ibise rudého.
- Genotypování polymorfních lokusů u dostatečného počtu jedinců ibise rudého pro získání jejich charakteristik a ověření genetických vztahů u chovné skupiny ibisů rudých v ZOO Dvůr Králové nad Labem.

3 Literární přehled

3.1 Řád brodiví (Ciconiiformes)

Do řádu brodivých se řadí pět čeledí a to: čápoovití (Ciconiidae), člunozobcovití (Balaenicipitidae), ibisovití (Threskiornithidae), kladivoušovití (Scopidae) a volavkovití (Ardeidae) (del Hoyo *et al.*, 1992). Těchto pět čeledí zahrnuje zhruba 113 druhů. Literární zdroje se však v počtu čeledí a druhů u tohoto řádu liší, nejčastěji je zmiňováno rozmezí 3 až 6 čeledí a 113 až 119 druhů (del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998; Burnie, 2002; Gaisler *et Zima*, 2007).

Do tohoto řádu patří především velcí ptáci, jejichž znakem je zejména dlouhý ohebný krk a dlouhé nohy (Gaisler *et Zima*, 2007). Dlouhé nohy zajišťují těmto ptákům to, že opeření zůstane při brodění v mělkých vodách suché, přičemž natahují dlouhý krk a hlavou se blíží k vodě, kde hledají svou potravu (Burnie, 2002). Na nohou mají tito ptáci čtyři prsty. Nejsilnějším prstem je palec, který zvětšuje nášlapnou plochu nohou (Šťastný *et al.*, 1998). Přední tři prsty spojují malé nebo větší blány, čímž se hmotnost ptáka při kráčení po bahně rozloží do šíře (Burnie, 2002). Všechny druhy v tomto řádu velmi dobře létají, zejména pak plachtí (Gaisler *et Zima*, 2007). Při letu se jednotlivé rody mohou docela dobře rozeznat, protože volavky a bukači dávají krk esovitě k tělu, zatímco čápi, kolpíci a ibisové mají krk natažený dopředu (Burnie, 2002).

Zobák u brodivých je obvykle úzký, ovšem u každého druhu je různě upraven a to podle způsobu získávání potravy. Žaludek mají třídičný a zpravidla postrádají vole (Gaisler *et Zima*, 2007). Všichni brodiví jsou masožravci a jejich potravou jsou především vodní živočichové (Šťastný *et al.*, 1998; Gaisler *et Zima*, 2007).

Hnízdění u brodivých probíhá zjara v mírném pásmu a celoročně v pásmu tropickém. Svá hnízda si stavějí obvykle na stromech nebo také v rákosinách a to buď jednotlivě v trvalých párech nebo v koloniích, které jsou tvořeny stovkami až tisíci páry (Šťastný *et al.*, 1998; Gaisler *et Zima*, 2007). Brodiví ptáci jsou většinou monogamní a o mláďata, která jsou nidikolní, se starají oba rodiče (Churý *et al.*, 1966).

Zástupci tohoto řádu se nacházejí v různých typech prostředí po celém světě, výjimkou jsou pouze pásma v blízkosti pólů (Forshaw, 1998). Nejvíce se vyskytují

v oblastech se sladkou vodou a teplým klimatem, kde v zimě nezamrzávají vodní plochy (Burnie, 2002).

3.1.1 Alternativní pojetí řádu brodivých

Řád brodivých je u některých autorů velmi různě popisován. Do řádu brodivých jsou někdy zařazeni jako čeled' i plameňáci, kteří jsou obvykle v samostatném řádu. V systému podle Sibleyho a Monroea (1990) je řád brodivých dělen na podřády bahňáci (Charadrii) a brodiví (Ciconii), kdy brodiví zahrnují 18 čeledí a to všechny čeledi dravců, veslonohých a dále čeledi plameňáků, potápek, potáplic, trubkonosích a tučňáků (Šťastný *et al.*, 1998). V dalším alternativním systému (Hackett *et al.*, 2008), získaném pomocí moderních studií DNA, je řád brodivých tvořen pouze čeledí čápoovitých (Ciconiidae). Zbývající čtyři čeledi tohoto řádu jsou řazeny do řádu veslonohých (Pelecaniformes), jelikož mají podle těchto studií fylogeneticky blíže k čeledím tohoto řádu. Řád veslonohých tedy představuje podle tohoto systému 9 čeledí. Čtyři čeledi patřící dříve do brodivých (člunozobcovití, kladivoušovití, ibisovití a volavkovití) a dalších pět čeledí tvoří tradiční zástupci tohoto řádu a to: anhingovití (Anhingidae), fregatkovití (Fregatidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae), pelikánovití (Pelecanidae) a terejovití (Sulidae). Čeled' faetonovití (Phaethontidae), která je běžně řazena do řádu veslonohých (Pelecaniformes), je v tomto systému v samostatné skupině. Stejně tak řád plameňáků a potápek, které jsou v tomto novém pojetí systému brány za fylogeneticky nejpříbuznější, jsou řazeny samostatně mimo tyto vodní ptáky.

3.1.2 Čeled' ibisovití (Threskiornithidae)

Do čeledi ibisovitých se řadí středně velcí ptáci, kteří se vyznačují lysinou okolo očí, dlouhým krkem, zobákem a dlouhýma nohama (Alderton, 1995; Šťastný *et al.*, 1998; Gaisler *et Zima*, 2007). Ptáci, zastoupení v této čeledi, se vyskytují, kromě Antarktidy, ve všech oblastech, nejvíce ale v tropech (del Hoyo *et al.*, 1992). Žijí ve velkých skupinách a to zejména na místech s mělkou vodou, která obvykle dočasně vysychají (Alderton, 1995).

Tato čeled' se rozděluje na 2 podčeledi, které jsou svým vzhledem velmi dobře odlišitelné. Jedná se o podčeled' ibisů (Threskiornithinae), vyznačující se srpovitě zahnutým delším zobákem a podčeled' kolpíků (Plataleinae), kteří jsou charakterističtí dlouhým zobákem na konci lžícovitě rozšířeným (Hanzák *et Hudec*, 1974).

V této čeledi je ve 2 podčeledích 13 rodů, které zahrnují 32 druhů, kdy 7 druhů je ohrožených. Z podčeledi ibisů patří mezi ohrožené druhy ibis běloramenný (*Pseudibis davisoni*), ibis obrovský (*Pseudibis gigantea*), ibis skalní (*Geronticus eremita*), ibis jihoafrický (*Geronticus calvus*), ibis čínský (*Nipponia nippon*) a ibis olivový (*Bostrychia bocagei*). V podčeledi kolpíků je ohroženým druhem kolpík malý (*Platelea minor*) (del Hoyo *et al.*, 1992; Forshaw, 1998).

3.1.3 Charakteristika ibise rudého (*Eudocimus ruber*) a zařazení do systému

Systematické zařazení ibise rudého (*Eudocimus ruber*) (del Hoyo *et al.*, 1992; Hackett *et al.*, 2008):

Kmen:	Strunatci (Chordata)
Podkmen:	Obratlovci (Vertebrata)
Nadtřída:	Čelistnatci (Gnathostomata)
Třída:	Ptáci (Aves)
Podtřída:	Praví ptáci (Ornithurae)
Nadřád:	Létaví (Neognathae)
Řád:	Veslonozí (Pelecaniformes)
Čeleď:	Ibisovití (Threskiornithidae)
Podčeleď:	Ibisové (Threskiornithinae)
Rod:	Ibis (<i>Eudocimus</i>)
Druh:	Ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)

Šarlatové peří činí z ibise rudého jednoho z nejvýrazněji zbarvených mokřadních ptáků světa. Ibis rudý je sytě červený, výjimkou jsou jenom konce křídel, které jsou černé (Gosler, 1994). Pohlaví se ve svém zbarvení peří neliší (Burnie, 2002), pouze neopeřené části těla jsou u samců načervenalé a v období hnízdění dochází i k zčervenání jejich zobáků (Gosler, 1994). Nedospělí jedinci mají hlavu a krk hnědobíle žíhané, ostatní části opeření jsou šedohnědé, kdy kostřec a spodní části těla jsou bílé (del Hoyo *et al.*, 1992; Gosler, 1994).

Ibis rudý hnízdí ve velmi rozsáhlých koloniích, které mohou čítat až tisíce jedinců (del Hoyo *et al.*, 1992). Jedinci vytvářejí v koloniích páry, ale i přesto často dochází k páření s jinými partnery (Burnie, 2002). Hnízda, která si staví těsně vedle sebe, jsou umístěná v korunách keřů nebo stromů nad vodou, čímž jsou chráněna před

některými predátory (Hanzák *et* Hudec, 1974; Alderton, 1995). Samice obvykle snáší dvě vejce, někdy 3 a velmi vzácně 4. Vejce jsou světle modrá s mnoha hnědočervenými skvrnami a jejich inkubační doba trvá 21 – 24 dnů (Olmos *et* Silva, 2001). Vylíhlá mláďata jsou pokryta černým prachovým peřím a k úplnému opeření dochází v průběhu prvního měsíce života (del Hoyo *et al.*, 1992).

Potravu si nachází, stejně jako i jiné druhy ibisů, zejména hmatem, který má velmi dobře vyvinutý. Loví tedy při chůzi, kdy svým dlouhým zobákem prohledává bahno a kalnou vodu. Jeho kořistí je vodní hmyz, malé rybky a především korýši, zejména pak krabi, kteří patří mezi jeho oblíbené pochoutky (Alderton, 1995; Burnie, 2002). Svou kořist hledá pouze ve dne, za stmívání se vrací na stromy, aby se snížilo riziko napadení predátory (Burnie, 2002).

Ibis rudý se vyskytuje zejména v severní části Jižní Ameriky a to v oblasti východního Ekvádoru, severní Kolumbie, severní Venezuely, Guyany a na pobřeží Brazílie až u delty řeky Amazonky (del Hoyo *et al.*, 1992). V těchto oblastech osídluje prostředí bažin, ústí řek a rýžová pole (Gosler, 1994). Ibis rudý není zatím celkově ohroženým druhem, ale postupně dochází v některých oblastech k poklesu jeho četnosti (del Hoyo *et al.*, 1992). Tento jev je důsledkem bezohledné lidské činnosti v mangrovových oblastech. Dochází k devastaci tohoto unikátního ekosystému a to má obzvláště vliv na živočichy, kteří zde žijí. Původní rozšíření ibise rudého bylo po celém brazilském pobřeží, nicméně během dvacátého století došlo k vymizení jedinců z východní a jižní oblasti brazilského státu Ceará, kteří zde tvořili více než 2/3 celkového počtu jedinců (Goncalves *et al.*, 2010). Dalším příkladem snížení množství jedinců je ostrov Trinidad, kde se dříve tento druh vyskytoval v hojném zastoupení, ale od roku 1970 zde již nehnízdí. Stejně tak tomu je i v Guyaně, kde se ibis rudý přestal vyskytovat od roku 1982 (del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998). Naproti tomu byla však v roce 1989, v oblasti Cubatãa v jižní Brazílii (Brazilský stát São Paulo), objevena izolovaná malá kolonie ibisů rudých, což může být ohniskem jejich dalšího rozšiřování (Santos *et al.*, 2006).

3.1.3.1 Mikrosatelity popsané u ibise rudého

Důležitým genetickým markerem, pro přesnější analýzu populačních procesů u ohrožených druhů ptáků, se staly mikrosatelity. Pomocí polymorfních mikrosatelitů se získají informace o celkové genetické diverzitě a příbuzenských vztazích mezi jedinci

ohrožených přírodních populací a právě toto může pomoci ve vývoji programů pro ochranu ohrožených jedinců (Santos *et al.*, 2006).

Polymorfní mikrosatelitové lokusy byly také získány a popsány u ibise rudého. Jedná se o deset mikrosatelitů Eru02 až Eru11, které byly izolovány z obohacené genomové knihovny. Ze tří přírodních brazilských populací bylo vybráno 45 jedinců a byly provedeny analýzy, kterými se stanovil počet alel na lokus 3-17. Těchto deset polymorfních mikrosatelitových lokusů mělo vytvořit první specificky odvozené molekulární markery od ibise rudého, díky kterým mohla být vyhodnocena celková genetická variabilita a tak i vytvořena správná ochranná strategie pro tento druh (Santos *et al.*, 2006).

Podle autorů Santos *et al.* (2006) měly být tyto mikrosatelity vysoce polymorfní, avšak jejich testováním v mé bakalářské práci (Vrbatová, 2009) jsem dostala úplně odlišné výsledky. Z těchto deseti mikrosatelitů vycházelo v mé bakalářské práci jako polymorfních pouze pět mikrosatelitů a to Eru03, Eru04, Eru06, Eru07 a Eru09. Navíc Obručová (2009) zjistila, že mikrosatelity Eru07 a Eru09 jsou orthologní sekvence, které byly při sekvenování přečteny v opačném směru. Tento poznatek vyvrátil tvrzení autorů Santos *et al.* (2006), že mezi lokusy Eru07 a Eru09 neexistuje žádná vazba. Tyto polymorfní mikrosatelity vykazovaly u dvaceti testovaných jedinců ibisů rudých rozmezí 2 až 10 alel na lokus. V tabulce č. 1 jsou porovnány výsledky autorů Santos *et al.* (2006) a výsledky z mé bakalářské práce Vrbatová (2009).

Tabulka č.1: Porovnání výsledků autorů Santos *et al.* (2006) a Vrbatová (2009) u mikrosatelitů Eru02-Eru11:

Název mikrosatelitu	Počet alel podle Santos <i>et al.</i> (2006)	Počet alel podle Vrbatová (2009)
Eru02	4	monomorfní
Eru03	9	5
Eru04	5	6
Eru05	6	monomorfní
Eru06	17	10
Eru07*	5	2
Eru08	4	monomorfní
Eru09*	5	2
Eru10	3	monomorfní
Eru11	3	monomorfní

Mikrosatelity označené * jsou totožné lokusy

3.2 Mikrosatelity v řádu brodivých

Úplně první ptačí mikrosatelity byly izolovány v řádu pěvců (Passeriformes) a to z DNA vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) a z DNA lejska černočelého (*Ficedula hypoleuca*) (Ellegren, 1992). Od této doby se počet izolovaných ptačích mikrosatelitů značně zvýšil. V řádu brodivých je z DNA deseti druhů izolováno přibližně 150 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Jedná se o druhy patřící do čeledi čápovitých, ibisovitých a volavkovitých. Díky těmto polymorfním mikrosatelitovým lokusům je možné u příbuzných druhů používat metodu *cross-species* amplifikace. Tato metoda je velmi vhodná pro hledání nových polymorfních lokusů a také mnohem výhodnější, na rozdíl od izolace *de novo*, která je jak finančně, tak časově velmi náročná

3.2.1 Mikrosatelity v čeledi čápovitých

Jako první, v řádu brodivých, byly izolovány mikrosatelitové lokusy z DNA nesyta lesního (*Mycteria americana*) patřícího do čeledi čápovitých. U nesyta lesního byly nejprve autory van den Bussche *et al.* (1999) popsány 4 mikrosatelitové lokusy s 2 až 3 alelami na lokus. Tento nízký počet alel, který byl nalezen u 136 jedinců pocházejících z devíti různých kolonií, je důsledkem vážného snížení počtu populací tohoto druhu. Autoři Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) později izolovali u nesyta lesního dalších jedenáct polymorfních mikrosatelitových lokusů, kdy stanovili počet alel 2 až 4 na lokus, přičemž testování provedli pouze na 31 jedincích ze dvou různých populací. Tyto pozdější studie u nesyta lesního potvrdily stále nízkou genetickou variabilitu v jeho populacích, ale zároveň zde byl i jistý náznak jejího pomalého vzrůstu. Nasvědčuje tomu nižší počet testovaných jedinců, u kterého byl zjištěn vyšší počet alel. Těchto 11 mikrosatelitových lokusů bylo testováno pomocí *cross-species* amplifikace u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), kdy šest lokusů bylo polymorfních (Shephard *et al.*, 2009).

U čápa bílého bylo z jeho DNA izolováno celkem 13 mikrosatelitových lokusů. Autoři Shephard *et al.* (2009) testováním na 30 jedincích čápa bílého izolovali 7 polymorfních mikrosatelitů, které vykazovaly alelové rozmezí na lokus 2 až 10. Dalších 6 mikrosatelitů našel profesor Segelbacher (osobní sdělení), avšak nepodařilo se mi od něho získat více informací o těchto lokusech.

3.2.2 Mikrosatelity v čeledi ibisovitých

V čeledi ibisovitých bylo u ibise japonského (*Nipponia nippon*) izolováno celkem 24 mikrosatelitových lokusů s rozmezím 2 až 5 alel na lokus. Nejdříve autoři Ji *et al.* (2004) popsali u ibise japonského 13 mikrosatelitových lokusů, kdy 8 z nich u něj bylo polymorfních s 2 až 3 alelami na lokus. V dalším studiu na ibisu japonském izolovali autoři He *et al.* (2006) 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů, s rozmezím 2 až 5 alel na lokus. Na DNA ibise japonského se testovaly také primery odvozené z DNA kura domácího (*Gallus gallus*), tura domácího (*Bos primigenius*) a kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Nalezly se 4 polymorfní mikrosatelitové lokusy, které vykazovaly 2 až 7 alel na lokus. Polymorfní produkt poskytly primery odvozené z DNA kapra obecného a tura domácího (Lei *et al.*, 2005). Primery, odvozené z DNA ibise japonského, byly pomocí *cross-species* mikrosatelitové amplifikace testovány u ibise černohlavého (*Threskiornis melanocephalus*). Nalezlo se 5 polymorfních mikrosatelitových lokusů, kdy jeden z těchto mikrosatelitů byl polymorfní pouze u ibise černohlavého, kdežto nebyl polymorfní u ibise japonského (Ji *et al.*, 2004). Též u ibise posvátného (*Threskiornis aethiopicus*) byly nalezeny dva polymorfní lokusy s počtem 4 a 12 alel na lokus a to při testování *cross-species* primerů odvozených z DNA ibise japonského a z DNA tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*) (Wilson, 2008).

Z podčeledi kolpíků bylo u kolpíka malého (*Platalea minor*) izolováno 23 mikrosatelitových lokusů, které vykazovaly vysoký polymorfismus, protože analýzou na 20 jedincích kolpíka malého se stanovilo rozmezí 2 až 19 alel na lokus. Tyto mikrosatelity se také testovaly pomocí *cross-species* mikrosatelitové amplifikace i u jiných druhů z řádu brodivých. Jednalo se o druhy ibise posvátného (*Threskiornis aethiopicus*), ibise rudého (*Eudocimus ruber*), kolpíka růžového (*Platalea ajaja*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a volavky bílé (*Ardea alba*). Autoři Yeung *et al.* (2009) v tomto článku neuvádějí, zda u těchto druhů byly mikrosatelitové lokusy polymorfní, ale pouze zde zmiňují intenzitu výsledných PCR produktů.

Dalším druhem kolpíků je kolpík růžový, u kterého autoři Sawyer *et Benjamin* (2006) popsali šest polymorfních mikrosatelitových lokusů, které vykazovaly 2 až 9 alel na lokus. Testování bylo provedeno na 61 jedincích, kteří pocházeli ze tří zoologických parků a z jedné přírodní populace.

3.2.3 Mikrosatelity v čeledi volavkovitých

Z čeledě volavkovitých bylo u volavky velké (*Ardea herodias*) popsáno 17 mikrosatelitových lokusů. 15 těchto lokusů bylo u volavky velké polymorfních a počet alel na lokus byl velmi vysoký, v rozmezí 2 až 18 alel. Testování se provedlo na 40 jedincích volavky velké pocházejících ze 4 různých populací (McGuire *et* Noor, 2002). Tito autoři testovali tyto mikrosatelity za pomoci *cross-species* mikrosatelitové amplifikace i u příbuzných druhů volavek. Jednalo se o jednoho jedince volavky bílé (*A. alba*) a volavky popelavé (*A. cinerea*) a dva jedince volavky jihoamerické (*A. cocoi*). U všech tří druhů se většina mikrosatelitů úspěšně amplifikovala a dávala polymorfní produkt, navíc u většiny lokusů vznikaly alely odlišných délek než jaké vznikaly u volavky velké. Z toho vyplývá, že tyto markery by mohly být úspěšně používány i u ostatních druhů volavek. Chang *et al.* (2005) testovali 8 z těchto 17 mikrosatelitových lokusů na DNA kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a všech 8 vyšlo jako polymorfní.

U další volavky, volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*), autoři Huang *et al.* (2009) popsali 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Autoři tyto mikrosatelity testovali na skupině 20 jedinců volavek žlutozobých a stanovili alelové rozmezí 2 až 9 alel na lokus. Většina těchto mikrosatelitových lokusů se také úspěšně amplifikovala u volavky stříbřité (*Egretta garzetta*), volavky pobřežní (*E. sacra*), volavky bílé, volavky čínské (*Ardeola bakchus*) a volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*). U volavky stříbřité se úspěšně amplifikovalo všech 18 lokusů. Autoři ovšem neuvádějí, zda u těchto druhů byly výsledné produkty polymorfní či nikoliv (Huang *et al.*, 2009).

Autoři Hill *et* Green (2011) izolovali z DNA 31 jedinců volavky červenavé (*Egretta rufescens*), pocházejících z jedné hnízdní kolonie, 12 polymorfních mikrosatelitových lokusů, u kterých zjistili rozmezí alel 2 až 10 na lokus.

U kvakoše nočního bylo izolováno 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů, které vykazovaly 4 až 13 alel na lokus. Tyto polymorfní lokusy autoři Chang *et al.* (2009) testovali u 11 různých druhů volavek, kde u většiny došlo k úspěšné *cross-species* mikrosatelitové amplifikaci. Autoři ale v článku neuvádějí, jestli výsledné produkty *cross-species* amplifikace vykazovaly polymorfismus (Chang *et al.*, 2009).

3.3 Repetitivní sekvence DNA

Nukleotidové sekvence DNA v jádře se dělí na dva typy a to na jedinečné a repetitivní. Jedinečné sekvence jsou jedenkrát zastoupeny v haploidním genomu určitého druhu a zahrnují většinu kódujících sekvencí. Tvoří jen malou část celkové DNA. U eukaryotních organismů převažuje v jaderném i mimojaderném genomu negenová DNA, kterou tvoří z menší části repetitivní sekvence, které mají různou délku a v haploidním genomu se mnohokrát opakují (Rosypal, 1997; Nečas *et al.*, 2000).

Repetitivní DNA lze rozdělit na dva typy. Prvním typem repetitivních sekvencí jsou rozptýlené repetice, které jsou roztroušeny po celém genomu (Alberts *et al.*, 1998). Podle délky se rozlišují na krátké rozptýlené repetice, které mají délku okolo 300 bp a na dlouhé rozptýlené repetice, které jsou delší než 300 bp (Rosypal, 1997).

Druhým typem jsou krátké, vysoce repetitivní sekvence, které jsou označovány jako satelitní DNA (Alberts *et al.*, 1998). Vyskytují se převážně v heterochromatinové oblasti centromery, jsou tedy v silně kondenzovaném stavu, a tím jsou transkripčně neaktivní (Csink *et Henikoff*, 1998). Tyto satelitní DNA se replikují v pozdní S fázi (Singer, 1982) a podle délky jejich motivu, který vytváří repetici, se dělí na minisatelity a na mikrosatelity, které jsou nazývané i STRs – *Short Tandem Repeats* (Flegr, 2009).

Minisatelity se vyznačují delším motivem repetice, který je tvořen minimálně 10 bp a více. Horní limit délky repetice není přesně definovaný (Kashi *et King*, 2006), ale zpravidla je délka repetice 10 až 75 bp (Taylor *et al.*, 1996). Mutabilita minisatelitů je mnohem vyšší v porovnání s mutabilitou mikrosatelitů (Fridolfsson *et al.*, 1997; Flegr, 2009).

3.3.1 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetitivní sekvence DNA, které mají délku opakující se repetice v rozmezí 1-6 bp. Díky jejich variabilnímu počtu repetic u jednotlivých jedinců jsou mikrosatelity vysoce polymorfní, a tím se stávají vhodnými markery pro molekulárně taxonomické studie (Schlötterer, 2000; Flegr, 2009). Vyskytují se v genových i v negenových oblastech hlavně u eukaryotických organismů (Zane *et al.*, 2002). U prokaryotických organismů se mikrosatelity nacházejí poměrně vzácně (Li *et al.*, 2004). Jejich přítomnost v kódujících a regulačních oblastech může

ovlivňovat genovou expresi. Studie ale ukázaly, že se mikrosatelity nacházejí především v nekódujících oblastech genomu (Subramanian *et al.*, 2002).

Hlavními typy repetice mikrosatelitů jsou repetice mononukleotidové, dinukleotidové, trinukleotidové a tetranukleotidové (Ellegren, 2004). V genomu primátů jsou běžnější mononukleotidové repetice, hlavně oblast poly (A/T). U mnoha druhů se však nejčastěji mikrosatelity vyskytují ve formě dinukleotidové repetice (48-67 %) (Li *et al.*, 2002). Příkladem je i savčí genom, ve kterém je 57 % všech sekvencí tvořeno dinukleotidovou repeticí CA (Flegr, 2009). Nejčastější trinukleotidová repetice u savců je AGC (Tóth *et al.*, 2000), ale u ostatních druhů je nejfrekventovanější CAG a AAT (Hancock, 1999).

3.3.1.1 Vlastnosti mikrosatelitů

V posledních letech vzrostl zájem o mikrosatelity, protože v kombinaci s PCR se z nich stávají velmi užitečné polymorfní DNA markery (Tautz *et Schlötterer*, 1994). Právě kodominantnost alel, vysoká úroveň polymorfismu a především dědičnost alel od obou rodičů na potomky, činí z mikrosatelitů náležité markery pro určování paternity a příbuznosti v populacích (Chistiakov *et al.*, 2006). Pro své značné zastoupení a rozmístění po celém genomu jsou také vhodné pro mapování lidských genů (Tóth *et al.*, 2000) a díky své malé velikosti jsou relativně stabilní i v degradované DNA, a tím mohou být široce využívány též ve forenzní genetice pro identifikaci jedinců (Chistiakov *et al.*, 2006).

Dalším důvodem zájmu o mikrosatelity je, že zmnožení kódujících trinukleotidových repetice je spojeno s řadou lidských genetických onemocnění. Příkladem může být Huntingtonova choroba, která je způsobená zmnožením tripletu CAG nebo spinobulbární muskulární atrofie, spinocerebrální ataxie či syndrom fragilního chromozomu X (Tóth *et al.*, 2000). Tyto mutantní mikrosatelity pak slouží v medicíně jako genetické markery pro diagnostiku těchto nemocí (Tautz *et Schlötterer*, 1994; Goldstein *et Schlötterer*, 1999). Celkovou výhodou je, že pro testování stačí malé množství DNA (Chistiakov *et al.*, 2006).

3.3.1.2 Mutace mikrosatelitových lokusů

U DNA markerů je stupeň polymorfismu úměrný rychlosti mutace. Vzhledem ke značnému polymorfismu mikrosatelitů je tedy jasné (Ellegren, 2004), že mutační

rychlost v mikrosatelitových lokusech je až o několik řádů vyšší než u jiných lokusů a odhaduje se řádově na lokus v rozmezí 10^{-2} - 10^{-6} nukleotidů za jednu generaci, přičemž záleží o jaký organizmus se jedná (Hancock, 1999; Oliveira *et al.*, 2006). Mutační rychlost se také zvyšuje v závislosti na délce alel, takže s počtem repetice roste i počet mutací (Whittaker *et al.*, 2003) a dále záleží i na délce repetitivního motivu. Dinukleotidové repetice mají mutační rychlost $5,6 \times 10^{-4}$ kdežto tetranukleotidové repetice $2,6 \times 10^{-3}$ (Weber et Wong, 1993).

Existuje několik mechanismů, které vysvětlují vysokou mutační rychlost u mikrosatelitů. Během rekombinace může dojít ke vzniku různých chyb, jako jsou třeba nerovnoměrný crossing-over či genová konverze a nebo v průběhu replikace či opravy DNA může docházet ke sklouznutí DNA polymerázy (Oliveira *et al.*, 2006). Poslední zmíněný mechanismus, tedy sklouznutí DNA polymerázy (*replication slippage*), je považovaný za hlavní zdroj variability u mikrosatelitů (Zima *et al.*, 2004). Díky tomu dochází ke vzniku alel, které se liší svojí délkou (Hancock, 1999), zpravidla o násobek délky motivu repetice. Proto je pak relativně snadné jednotlivé alely od sebe rozeznat při běžné polyakrylamidové elektroforéze (Flegr, 2009).

3.3.1.3 Mutační modely

Mutační modely se používají pro odvozování předpokládaného počtu alel v populaci z pozorované heterozygotnosti a pro stanovení genetické variability v populacích. Mutační modely se také snaží popsat vznik polymorfizmů u mikrosatelitových lokusů. Obecně jsou známy čtyři mutační modely, avšak každý model má určité nevýhody při aplikaci u mikrosatelitů (Huang *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006):

- A) Krokový mutační model – SMM (*stepwise mutation model*). Tento model předpokládá, že se velikost mikrosatelitu změní buď delecí nebo duplikací jen o jednu repetiční jednotku. Model SMM však neumí vysvětlit absenci velmi dlouhých alel a to, že nesměřuje ke konstantnímu rozdělení jednotlivých alel (Huang *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006).
- B) Dvoufázový mutační model - TPM (*two phase model*). Vychází z modelu SMM, ale nevyklučuje výskyt větších mutací. Rozdíl spočívá tedy v tom, že pokud vznikne kroková mutace s pravděpodobností p , tak vícefázové mutace vzniknou s pravděpodobností $1-p$ (di Rienzo *et al.*, 1994).

- C) Model nekonečných alel – IAM (*infinite allele model*). V tomto modelu vytváří náhodně každá duplikace nebo delece různého počtu repetice, vždy nové alely. Vznikají tedy alelové stavy, které nejsou ještě v populaci zastoupeny (Oliveira *et al.*, 2006).
- D) Model K -alely - (*K-allele model*). Model popisuje všechny možné vzniklé nové alely jako K a pravděpodobnost každé alely mutovat na jinou je $K - 1$ (Balloux *et* Lugon-Moulin, 2002).

U všech těchto mutačních modelů, kromě modelu IAM, mohou alely mutovat do takových alelových stavů, které již v různých populacích existují, a tím se vytváří homoplazie mikrosatelitu (Estoup *et al.*, 2002).

3.3.2 Homoplazie mikrosatelitů

U mikrosatelitových lokusů je často rozšířená homoplazie, což je jev, kdy mají alely stejnou velikost, ale přitom jsou neidentické svým původem. Homoplazie vzniká jako důsledek mutace, kdy se vytváří velikostně stejné alely u nepříbuzných jedinců. Homoplazii můžeme dělit na dvě třídy, kdy jsou lokusy mikrosatelitů totožné ve své délce, ale ne ve svých sekvencích a nebo jsou shodné v délce i v sekvencích. První třída se detekuje pomocí sekvenování lokusů a druhá třída pomocí rodokmenů, které obsahují mutační procesy (Angers *et al.*, 2000; Scribner *et* Pearse, 2000; Anmarkrud *et al.*, 2008). Při studiu vzdáleně příbuzných populací činí homoplazie potíže, jelikož právě podle různé délky alel se určují jednotlivé mikrosatelitové alely (van den Bussche *et al.*, 1999).

3.3.3 Nulové alely

Nulové alely mikrosatelitů jsou alely, u nichž neproběhne úspěšně PCR amplifikace, nevzniká u nich tedy produkt a to proto, že dochází k mutaci v místech, kde primery nasedají na templátovou DNA. Tyto alely se mohou též vytvořit během amplifikace alel odlišných délek, protože kratší alely se amplifikují účinněji ve srovnání s delšími alelami, jako následek kompetitivního charakteru PCR. Tento jev se vyskytuje jen výjimečně a takové alely mohou být objeveny, pokud do reakce dodáme více templátové DNA. Nulové alely mohou vznikat i v případě špatné kvality templátové DNA, kdy opět neproběhne PCR reakce (Wattier *et al.*, 1998; Dakin *et* Avise, 2004).

Hlavním problémem nulových alel je jejich výskyt při testech paternity. Pokud jsou totiž rodiče heterozygotní pro nulovou alelu, jsou genotypově vyhodnoceni jako homozygoti a tím jejich genotyp neodpovídá genotypu jejich potomků, čímž se označí jako nepříbuzní (Dakin *et* Avise, 2004). Nulové alely mohou být odhaleny díky odchylce alelových četností od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a nebo také výrazný nedostatek heterozygotů v populaci vede k podezření na přítomnost nulových alel (Newman *et* Square, 2001; Jones *et* Ardren, 2003).

3.3.4 Princip hledání nových mikrosatelitových lokusů

U většiny druhů musí být nové mikrosatelitové lokusy obvykle získány *de novo*, což je velmi drahé a časově náročné. Proto se u příbuzných druhů využívá hledání pomocí PCR amplifikace *cross-species* primerů (Carreras-Carbonell *et al.*, 2008).

A) Hledání mikrosatelitových lokusů *de novo*

Nejprve musí být z cílového druhu izolována genomická DNA, která je poté naštípána pomocí restričních enzymů. Následně se provede separace naštípané DNA v agarózovém gelu, přičemž se získají fragmenty DNA požadované délky (300-700 bp). Tyto fragmenty se vloží do plazmidového vektoru, kdy následuje transformace tohoto vektoru do vhodné bakterie. Transformované klony jsou přemístěny na nylonovou membránu, provede se hybridizace se značenou oligonukleotidovou sondou, která obsahuje tandemové repetice a tím se vyberou pozitivní klony (obsahují repetice), které se osequencují. Tak mohou být navrženy primery pro PCR, s kterými se provede amplifikace a poté se stanoví polymorfismus mikrosatelitových lokusů. Nakonec se určí vypovídací schopnost polymorfního mikrosatelitu a to podle jeho počtu alel a jejich frekvence (Zane *et al.*, 2002).

B) Hledání mikrosatelitových lokusů použitím *cross-species* primerů

V tomto postupu se pro hledání polymorfismu u cílového druhu využívá PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů s primery, které byly již dříve *de novo* izolovány u taxonomicky příbuzných druhů. Obecně platí, že čím si jsou druhy fylogeneticky příbuznější, tím je tato metoda úspěšnější (Mohindra *et al.*, 2005; Carreras-Carbonell *et al.*, 2008). Jestliže se tedy *cross-species* amplifikace použije u evolučně vzdálenějších

druhů, je obvykle výsledný polymorfismus u testovaných druhů nižší, v porovnání s druhem, u kterého byl lokus objeven (Fridolfsson *et al.*, 1997).

3.4 Mikrosatelity v ptačím genomu

V ptačím genomu je hustota mikrosatelitů, v porovnání s lidským genomem, podstatně nižší. Důvodem je, že výskyt mikrosatelitů v genomu koreluje s jeho velikostí, která je u ptáků mnohem menší než u ostatních obratlovců. Obecně je v ptačím genomu přítomen jeden mikrosatelit každých 20 až 39 kb (Primmer *et al.*, 1997), zatímco u člověka je pravděpodobnost výskytu mikrosatelitu každých 6 kb (Ellegren, 1992). Lze to vysvětlit tím, že v ptačím genomu je poměrně málo nekódující DNA než u většiny savců a že ptačí elementy SINE/LINE nejsou zakončeny konci poly (A), které jsou zdrojem pro tvorbu tandemových repetitů u savců (Primmer *et al.*, 1997).

3.4.1 Použití mikrosatelitů v ornitologii

Pro své vlastnosti jsou mikrosatelity velice vhodnými markery v ornitologii a to ke stanovení příbuzenských vztahů, vnitrodruhového parazitizmu a mimopárové kopulace (Ellegren, 1992). Příbuzenské vztahy se určují pomocí polymorfních mikrosatelitových lokusů a to podle délek jednotlivých alel, které můžeme hodnotit pomocí elektroforetických metod a následně vizualizovat (Scribner *et al.*, 2000). Za polymorfní lokusy se považují ty, u kterých je výskyt jejich nejčtenější alely maximálně v rozmezí 95-99 % (Zima *et al.*, 2004).

U mikrosatelitů je nevýhoda, že nemůžeme využívat pro amplifikaci univerzální PCR primery, které by amplifikovaly PCR produkt u širokého spektra druhů, ale obvykle se musí izolovat *de novo* pro každý nový druh. Avšak v dnešní době je již známo u mnoha druhů ptáků, především pak z řádu pěvců (Passeriformes), velké množství mikrosatelitů, proto je možnost u příbuzných druhů používat *cross-species* mikrosatelitovou amplifikaci, aniž bychom museli prvně izolovat nové mikrosatelity (Primmer *et al.*, 2005). Nicméně, čím jsou druhy evolučně vzdálenější, tím klesá možnost, že bude daný mikrosatelit, který byl polymorfní u jednoho druhu, polymorfní i u testovaného druhu (Primmer *et al.*, 1996).

3.5 PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR (*polymerase chain reaction*) je technika, díky které je možné *in vitro* amplifikovat v neomezeném množství žádaný specifický úsek DNA, přičemž množství DNA ve vzorku může být i velmi nízké (Zima *et al.*, 2004). Podstatou PCR je cyklicky opakovaná enzymová syntéza nových řetězců DNA pomocí DNA-polymerázy a to ve směru 5'→3'. Požadovaný úsek nukleotidové sekvence se vymezení připojením dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že proti sobě směřují jejich 3'-konce (Šmarda *et al.*, 2005). Primery jsou uměle syntetizované krátké oligonukleotidy, a proto je amplifikace DNA pomocí PCR možná jen tehdy, je-li známá začáteční a koncová nukleotidová sekvence budoucího amplifikátu. Po nasednutí primeru syntetizuje DNA-polymeráza vždy jednu kopii požadované nukleotidové sekvence. Díky tomu, že reakce probíhá v několika cyklech (obvykle 20-30 cyklů), může na konci reakce vzniknout až miliarda kopií žádaného úseku DNA. Vzniklé fragmenty požadované délky jsou po gelové elektroforéze a barvení snadno hodnotitelné (Rosypal, 1997; Alberts *et al.*, 1998).

3.5.1 Princip PCR

PCR je proces, při kterém se postupně střídají tři kroky a to v závislosti na teplotě reakční směsi, která musí obsahovat templátovou DNA, reakční pufr, MgCl₂, dva oligonukleotidové primery, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), DNA polymerázu a deionizovanou vodu (Šmarda *et al.*, 2005).

Prvním krokem PCR je denaturace dvouřetězcové DNA, při které se reakční směs zahřívá na 94 °C a dochází k rozdělení dsDNA na jednotlivé řetězce (Raclavský, 1998). Druhým krokem je zchlazení reakční směsi na 45-65 °C a navázání primerů (*annealing*). Tento krok je nejdůležitější, protože úspěch PCR závisí právě na správném navázání primerů (Mazura *et al.*, 2001; Zima *et al.*, 2004). Třetím krokem je syntéza nových řetězců podle denaturované templátové DNA. Reakční směs je zahřátá na 72 °C, tím se aktivuje termostabilní polymeráza rozeznávající volné 3'-konce primerů a začne syntéza nového řetězce ve směru 5'→3' (Raclavský, 1998).

3.6 Partnerské vztahy u ptáků

Partnerské vztahy u ptáků jsou velmi rozmanité a to jak délkou trvání, tak i typem daného svazku (Veselovský, 2001).

Nejzastoupenějším partnerským vztahem u ptáků je monogamie. Monogamie je tradičně definována jako svazek jednoho páru, kdy spolu oba rodiče pečují o potomstvo a chrání svoje hnízdo (Dias *et al.*, 2009).

Dalším svazkem je polygamní vztah, který tvoří buď více samic, nebo více samců. Pokud se samice páří se dvěma, nebo i více samci, nazýváme tento vztah polyandrií a pokud je tomu naopak, tedy samec se páří s více samicemi, pak mluvíme o polygynii. Existuje i polygynandrie, též kooperativní polyandrie, kdy je vytvořena skupina několika samců a samic vzájemně se pářících a starajících se o své potomstvo.

Posledním vztahem je promiskuita. Jedná se o volný, krátký sexuální vztah, při kterém se samec bez individuálního svazku páří s jakoukoliv samicí, která je fyziologicky připravena na páření. V tomto případě péči o potomstvo přejímá pouze samice (Veselovský, 2001).

3.6.1 Mimopárové rodičovství

Definice monogamie se velmi změnila příchodem molekulárních technik. Dříve bylo považováno za monogamní více než 90 % druhů ptáků, ale nové genetické studie ukázaly, že u mnoha druhů dochází k mimopárové kopulaci, což vede k rostoucí polygamii a nebo k rozšíření mimopárové paternity (Petrie *et al.*, 1998; Augustin *et al.*, 2007). Proto je nyní monogamie dělena na dva typy a to na sociální a genetickou. Zatímco sociální monogamie je obvyklá, genetická monogamie běžná není a vyskytuje se jen asi u 14 % známých druhů. Sociální monogamie představuje párový svazek během období hnízdění, zatímco genetická monogamie je charakterizována nepřítomností mimopárové paternity (EPP – *extra-pair paternity*), ale není nezbytně vyloučena přítomnost EPC (*extra-pair copulation*), tedy mimopárové kopulace (Dias *et al.*, 2009).

Mimopárovou paternitou se myslí to, když má samec mládě s jinou samicí, než s tou se kterou tvoří pár (Kleven *et al.*, 2007). Stupeň EPP mezi jedinci může záviset na tom, jaký prospěch z toho jedinci mají a na příležitosti mimopárově kopulovat

(Augustin *et al.*, 2007). Mezidruhové studie prokázaly výskyt EPP v souladu s několika událostmi jakými je například úmrtnost, nutnost přítomnosti samce v péči o potomstvo, morfologická charakteristika a genetická variabilita (Bouwman *et Komdeur*, 2006). Pokud jde například o druhy, kdy samice nepotřebují pro výchovu svých mláďat samce nebo o druhy, které mají krátkou průměrnou délku života, dochází k mimopárovému oplození mnohem častěji. Důvodem je, že samice se nebojí ztráty partnera, jelikož ho pro výchovu mláďat nevyžadují a u druhů s krátkým reprodukčním obdobím jsou samci vůči EPP tolerantnější než samci druhů, kteří mají dlouhou průměrnou délku života (Griffith *et al.*, 2002).

Úroveň EPP může být ovšem vysoce různorodá nejen mezi druhy, ale také mezi populacemi stejného druhu (Bouwman *et Komdeur*, 2006). V průměru je 11 % mláďat zplozeno jiným samcem, než tím, který o potomstvo pečuje spolu se samicí. Toto číslo je vždy vyšší u pěvců (Kleven *et al.*, 2007). Naopak je tomu například u dravých ptáků, sov, papoušků a mořských ptáků, zde je výskyt mimopárových mláďat velmi vzácný (Masello *et al.*, 2002).

Existuje také mimopárová maternita (EPM - *extra-pair maternity*), která ale souvisí s hnízdním parazitismem a nikoliv s mimopárovou kopulací (Augustin *et al.*, 2007).

4 Materiál a metody

4.1. Biologický materiál

DNA pro analýzy byla vyizolována z krve ibise rudého (*Eudocimus ruber*). Krev byla odebrána jedincům pocházejícím z chovné skupiny v ZOO Dvůr Králové nad Labem a to pracovníky ZOO. Vzorky byly odebrány tak, že k 1 ml konzervačního Queen's pufu (Seutin *et al.*, 1991) se přidalo 20-30 μ l krve z křídelní žíly.

4.2. Izolace DNA z krve ibise rudého

Izolace DNA byla provedena podle Maniatis *et al.* (1982) a byla upravena tak, aby vyhovovala podmínkám Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci.

1. Do mikrozkušavky jsem k 500 μ l roztoku krve s Queen's pufrem (100 μ l krve a 400 μ l Queen's pufu) přidala 100 μ l roztoku SDS a 100 μ l proteinázy K (10 mg/ml). Nechala jsem přes noc inkubovat (za stálého překlápění) v termostatu při 37 °C.
2. Druhý den jsem k této směsi přidala 300 μ l fenolu a 300 μ l chloroformu. Směs jsem zvortexovala a zcentrifugovala (5000 g/5 min).
3. Do nové mikrozkušavky jsem opatrně odebrala ustřiženou špičkou horní fázi a to tak, abych nenasála proteinovou mezifázi.
4. K odebranému roztoku v nové mikrozkušavce jsem přidala 600 μ l chloroformu. Zvortexovala jsem a zcentrifugovala (5000 g/5 min). Pak jsem odebrala ustřiženou špičkou opět horní fázi do nové zkumavky bez nasátí bílého zákalu proteinové mezifáze. Krok 4 jsem zopakovala.
5. Přidala jsem 180 μ l vychlazeného octanu sodného (3 mol/l) a vychlazeným 96% ethanolem jsem doplnila zbytek objemu mikrozkušavky. Směs jsem promíchala a uložila na 2 hodiny do -20 °C.
6. Centrifugovala jsem 40 minut při 13 000 g, poté jsem slila ethanol (nesmí dojít k vylití sraženiny DNA) a přidala 1 ml vychlazeného 70% ethanolu. Centrifugovala jsem 10 minut při 13 000 g.

7. Ethanol jsem opatrně slila (nesmí dojít k vylití sraženiny DNA) a mikroskopickou vialku vysušila při 55 °C v termobloku. K vysušené DNA jsem přidala 500 µl TE pufru.
8. Nechala jsem přes noc rozpouštět (za překlápění) při teplotě 40 °C.
9. Na fluorometru jsem stanovila koncentraci DNA, kdy pro PCR je koncentrace DNA roztoku 50 µg/ml a pak jsem roztok DNA dala zamrazit při -20 °C. Pro další použití se musí opakovat krok 8, aby byla DNA pořádně rozpuštěná. U vzorků DNA, které měly koncentraci vyšší než požadovaných 50 µg/ml, jsem provedla ředění TE pufrům.

4.3 PCR amplifikace DNA

Složení PCR mixu pro 27 vzorků (včetně počítaných ztrát při pipetování).

Deionizovaná voda	199 µl
Storage Buffer 10 x	29,6 µl
Roztok MgCl ₂ o koncentraci 25 mmol/l	17,6 µl
Roztok dNTPs o koncentraci 20 µmol/l	3,04 µl
Primer F o koncentraci 10 µmol/l	14,5 µl
Primer R o koncentraci 10 µmol/l	14,5 µl
<i>aTaq</i> DNA polymeráza 5 U/µl	5,28 µl

Všechny mikroskopické vialky jsem po napipetování všech složek krátce zvortexovala a zcentrifugovala. Každá reakce obsahovala 9 µl PCR mixu a 1 µl roztoku DNA o koncentraci 50 µg/ml.

Časový a teplotní profil PCR reakce byl následující:

1. 5 min: 94 °C
2. 35 x: 30 s: 94 °C
30 s: 46-69 °C (podle použitých primerů)
30 s: 72 °C
3. 7 min: 72 °C

Přehled všech testovaných primerů spolu s údaji, od kterého druhu byly odvozeny, je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Souhrn testovaných mikrosatelitových lokusů u ibise rudého (*Eudocimus ruber*). Sloupce v tabulce uvádějí: řád, do kterého patřily zdrojové druhy, zdrojový druh, testované mikrosatelitové lokusy a literární zdroj.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitové lokusy	Literární zdroj
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>)	Eru03, Eru04, Eru06, Eru07	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 Benjamin</i> , 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 červenavá (<i>Egretta rufescens</i>)	Er21, Er22, Er23, Er24, Er31, Er42, Er42, Er43, Er44, Er45, Er46, Er51	Hill <i>et Green</i> , 2011
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 Noor</i> , 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	
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>)	GimA9, GimA12, GimC5, GimC11, GimD9, GimD12, GimE11	McMillan <i>et al.</i> , 2004
Dlouho-křídlí	Alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	Apy06, Apy07	Dawson <i>et al.</i> , 2005

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitové lokusy	Literární zdroj
Vrubozobí	Kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APH07, APH 09, APH08, APH12, APH13, APH16	Maak <i>et al.</i> , 2000
	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, kdy rozměry skel byly 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu byla 0,4 mm.

- 1) Skla jsem omyla vodou, na kratší sklo jsem použila i saponát a vydrhla kartáčem. Pak jsem skla opláchla deionizovanou vodou, osušila papírovými ručníky, opláchla 96% ethanolem (dvakrát) a znova osušila.
- 2) Plochu většího skla, která se dotýká gelu, jsem ošetřila přípravkem pro odpuzování vody a nechala zaschnout 5 minut. Pak jsem sklo opláchla deionizovanou vodou a osušila.
- 3) Plochu kratšího skla, která se dotýká gelu jsem ošetřila roztokem molekulárního lepidla. Nechala jsem 5 minut zaschnout a poté čtyřikrát opláchla 96% ethanolem (pokaždé jsem osušila papírovým ručníkem).
- 4) Do digestoře jsem na podložku položila větší sklo ošetřenou plochou nahoru, na něj jsem po stranách položila spacers a na ně kratší sklo ošetřenou plochou dolů. Ke kratšímu sklu jsem přitlačila gumu spacerů a poté jsem na obou stranách sepnula obě skla dvěma klipsy v místě spacerů.

- 5) Gel jsem připravila v kádince smísením 60 ml 6% roztoku akrylamid : N, N'-metylenbisakrylamid 19 : 1, 40 μ l N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu a 400 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného. Vše jsem promíchala a pomalu nalévala mezi skla. Poté jsem mezi skla zasunula asi 0,7 až 1 cm hluboko hřebínek rovnou stranou. Skla jsem v tomto místě sepnula čtyřmi klipsy a hodinu nechala gel polymerizovat.
- 6) Jakmile ztuhl gel, odstranila jsem klipsy, skla s gelem omyla, osušila a hranou s hřebínkem nahoru upevnila do elektroforetické komůrky (kratší sklo k hliníkové desce).
- 7) 0,5 x TBE pufrem jsem zalila katodový i anodový prostor, hřebínek jsem vytáhla a mezeru mezi skly vyčistila proudem nasátého pufru z injekční stříkačky. Prostor jsem zavřela, nasadila jsem elektrody a nastavila na zdroji stejnosměrného elektrického proudu hodnotu výkonu 90 W (hodnoty elektrického napětí i proudu byly nastaveny na maximum: 3000 V / 150mA). Gel jsem asi 30 minut nahřívala.
- 8) Než jsem nanesla vzorky, které obsahovaly 1 objemový díl PCR produktu a 1/2 dílu nanášecího pufru, vložila jsem je na 3 minuty do denaturačních podmínek (95 °C). Poté jsem vzorky ihned dala do ledové tříště.
- 9) V průběhu denaturace jsem vypnula zdroj stejnosměrného elektrického proudu, opět vyčistila mezeru pro hřebínek od rozpuštěné močoviny a zbylého polyakrylamidu. Do mezery jsem zasunula hřebínek zoubky do gelu asi 1,5 mm hluboko.
- 10) Vzorky jsem nanesla pipetou po 2 μ l (nebo po 0,5 μ l) do mezer zoubků u hřebínku, uzavřela jsem katodový prostor a nastavila na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jako limitní faktor hodnotu výkonu 70 W.
- 11) Po ukončení elektroforetického dělení vzorků jsem gel se skly vyjmula a položila kratším sklem nahoru. Vytáhla jsem spacers a nožem oddělila od sebe skla.
- 12) Sklo s přilepeným gelem jsem dala do fotomisky na třepače, zalila fix/stop roztokem a nechala 20 minut působit. Poté jsem fix/stop roztok slila a sklo s gelem 3 krát vymyla po minutě deionizovanou vodou.
- 13) Následně jsem gel vložila do fotomisky na třepače do 1% roztoku HNO₃ a 4 minuty promývala. Roztok jsem vylila a sklo s gelem 4 krát vymyla po minutě deionizovanou vodou. Gel jsem vložila do fotomisky na třepače do 0,1% roztoku AgNO₃ a 30 minut nechala působit. Připravila jsem fotomisku s 1-2 l deionizované vody.

- 14) Roztok AgNO₃ jsem slila do zásobní lahve, sklo s gelem jsem na chvíli ponořila do fotomisky s deionizovanou vodou, a poté vložila do fotomisky na třepače do vývojky a pozorovala vyvíjení obarvených proužků PCR produktů. Vyvíjení jsem zastavila přilítím fix/stop roztoku, když už byly proužky dobře viditelné a než se začalo tvořit tmavé pozadí. Nechala jsem působit přibližně 2 minuty.
- 15) Pak jsem sklo s gelem dala na 2 minuty do deionizované vody a následně nechala sušit v sušárně 1 hod při 60 °C. Po vysušení bylo sklo hodnoceno na negatoskopu.
- 16) Skla s již nepotřebným gelem se vkládala do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l. Gel se po několika hodinách od skla zcela odlepil a skla se umyla.

4.5 Použité 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 (Na₂EDTA) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Lachema)
- Fenol (pH: 7,9 ± 0,2) (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hoechst, trihydrochlorid No. 33258 (Sigma)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Chloroform (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)
- Kyselina chlorovodíková 35% roztok (Lachema)
- Kyselina octová – ledová (Lachema)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N - lauroylsarkosin (Sigma)
- N,N' - methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- Octan sodný - trihydrát (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Proteináza K (Sigma)

- Rain Repellent - přípravek odpuzující vodu ze skel automobilů (Turtle Wax Europe B.V.)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.6 Použité roztoky

Akrylamid : N,N'- methylenbisakrylamid 19:1 – 40% zásobní roztok:

380 g akrylamidu

20 g N,N'- methylenbisakrylamidu

rozpustit v 500 ml deionizované H₂O

objem doplnit na 1 l a roztok uložit v temné lahvi ve 4 °C

Akrylamid – 6% zásobní roztok:

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 zfiltrvat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

Dusičnan stříbrný AgNO₃ – 0,1% roztok:

0,8 g AgNO₃

objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Fenol (pH: 7,9 ± 0,2):

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

6,5 ml ekvilibračního pufru, pH 10,5 (Sigma B-5658) (Tris 0,01 mol/l; EDTA 0,001 mol/l; pH 8,0)

před prvním použitím protřepat, nechat 2-4 hodiny stát a trvale uchovávat při 4 °C

Fix/stop roztok:

80 ml ledové kyseliny octové

objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

Hydroxid sodný NaOH (1 mol/l):

40 g hydroxidu sodného

doplnit deionizovanou vodou do 1 l

Roztok 1% kyseliny dusičné HNO₃:

12 ml 65% HNO₃

objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

Laurylsíran sodný (SDS) – 10% roztok:

100 g laurylsíranu sodného

rozpustit v 900 ml deionizované vody
pH upravit na 7,2 pomocí 35% kyseliny chlorovodíkové (50 µl)
doplnit deionizovanou vodou do 1 l

Molekulární lepidlo:

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

Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

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

Octan sodný CH₃COONa - roztok (3 mol/l):

408,24 g trihydrátu octanu sodného
rozpustit v 800 ml deionizované vody
pH upravit na 5,2 pomocí ledové kyseliny octové
doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Peroxodisíran amonný (NH₄)₂S₂O₈ – 10% roztok:

1 g peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈
rozpustit v 10 ml deionizované H₂O
uchovávat v mikrozkuškových po 400 µl v – 20 °C

Polyakrylamidový 6% gel:

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

Pufr pro fluorimetrické stanovení koncentrace DNA (pro 20 měření):

36 ml deionizované vody
4 ml 10 x TNE pufru
4 µl roztoku Hoechst No.33258

Queen's pufr:

10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
2 ml zásobního roztoku NaCl (5 mol/l)
2,92 g EDTA
10 g N-lauroylsarkosinu
rozpustit v 900 ml deionizované vody
pH upravit na 7,5
doplnit deionizovanou vodou na 1 l

TBE pufr – 10 x zásobní roztok:

108 g Tris
55 g kyseliny borité H₃BO₃
40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
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 vody, poté doplnit na 1 l
zfiltrvat

TNE pufr – 10 x zásobní roztok:

12,11 g Tris
3,72 g Na₂EDTA
116,89 g NaCl
rozpustit v 800 ml deionizované vody
upravit pH na 7,4
doplnit na 1000 ml deionizovanou vodou a zfiltrvat, uložit při 4 °C

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

4.7 Laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)
- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy, typ MARK S 622 (Bel Engineering)
- Mikropipety Finnpiette 0,5 až 10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl až 1 ml (ThermoLabsystems)
- Mikropipety Nichipipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga Cleaver Scientific Ltd
- Negatoskop NEGA1 (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 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Vyhřívaná magnetická míchačka s regulací teploty a otáček Mr Hei - Standard (Heidolph)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5 Výsledky

6 Diskuze

7 Závěr

V rámci své diplomové práce jsem u ibise rudého (*Eudocimus ruber*) hledala pomocí *cross-species* mikrosatelitové amplifikace polymorfnní lokusy, které jsem dále použila pro stanovení genotypů jedinců ibisů rudých. Pro tento účel jsem testovala mikrosatelity izolované z DNA fylogeneticky příbuzných jedinců z řádu brodivých a dále z řádu dlouhokřídlých, potápek, potáplíc, sudokopytníků, tučňáků a vrubozobých.

Testováním 170 párů primerů jsem u ibise rudého našla 13 polymorfnních mikrosatelitů. K těmto 13 mikrosatelitům, jsem pro další testování, přidala čtyři polymorfnní mikrosatelity Eru03, Eru04, Eru06 a Eru07, které jsem testovala už ve své bakalářské práci. Těchto celkem 17 polymorfnních mikrosatelitů jsem použila pro vygenotypování 7 nepříbuzných jedinců ibisů rudých. Podle výsledných alelových konstitucí jednotlivých mikrosatelitů, jsem vybrala 9 nejpolymorfnnějších a ty jsem amplifikovala na DNA 27 jedinců ibisů rudých pocházejících z chovné skupiny ze ZOO Dvůr Králové nad Labem. Pomocí zjištěných genotypů jsem dále provedla statistickou analýzu těchto 9 mikrosatelitů a vybrala 4 nejvhodnější pro ověření příbuzenských vztahů u chovné skupiny jedinců ibisů rudých. Jelikož ZOO dodala pouze část vzorků z chovné skupiny, nepodařilo se mi příbuzenské vztahy ověřit.

8 Seznam zkratek

A	adenin
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
C	cytozin
dATP	deoxyriboadenozin trifosfát
dCTP	deoxyribocytydin trifosfát
dGTP	deoxyriboguanidin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
dTTP	deoxyribotymidin trifosfát
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
EPC	mimopárová kopulace (<i>extra-pair copulation</i>)
EPP	mimopárová paternita (<i>extra-pair paternity</i>)
EPM	mimopárová maternita (<i>extra-pair maternity</i>)
G	guanin
H _E	očekávaná heterozygotnost (<i>expected heterozygosity</i>)
H _O	pozorovaná heterozygotnost (<i>observed heterozygosity</i>)
IAM	mutační model nekonečných alel (<i>infinite allele model</i>)
kb	kilobáze
LINE	dlouhé rozptýlené repetice (<i>long interspersed element</i>)
mtDNA	mitochondriální DNA
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
SDS	lauryl síran sodný (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SINE	krátké rozptýlené repetice (<i>short interspersed element</i>)
SMM	krokový mutační model (<i>stepwise mutation model</i>)
STRs	krátké tandemové repetice (<i>short tandem repeats</i>)
T	tymin
T _a	teplota annealingu (<i>annealing temperature</i>)
T _m	teplota tání (<i>melting temperature</i>)
TPM	dvoufázový mutační model (<i>two phase model</i>)

9 Použitá literatura

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998): *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem.
- Alderton, D. (1995): *Ptáci*. Edice Příroda. Nakladatelský dům OP, Praha.
- Angers, B., Estoup, A., Jarne, P. (2000): Microsatellite size homoplasy, SSCP, and population structure: A case study in the Freshwater Snail *Bulinus truncatus*. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1926-1932.
- Anmarkrud, J.A., Kleven, O., Bachmann, L., Lifjeld, J.T. (2008): Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus *HrU10*. *BMC Evolutionary Biology* 8, 1-10.
- Augustin, J., Blomqvist, D., Szép, T., Szabó, Z.D., Wagner, R.H. (2007): No evidence of genetic benefits from extra-pair fertilisations in female sand martins (*Riparia riparia*). *Journal of Ornithology* 148, 189-198.
- Balloux, F., Lugon-Moulin, N. (2002): The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11, 155-165.
- Bouwman, K.M., Komdeur, J. (2006): Weather conditions affect levels of extra-pair paternity in the reed bunting *Emberiza schoeniclus*. *Journal of Avian Biology* 37, 238-244.
- Burnie, D. (2002): *Zvíře*. *Obrazová encyklopedie živočichů všech kontinentů*. Knižní klub, Praha.
- Carreras-Carbonell, J., Macpherson, E., Pascual, M. (2008): Utility of pairwise mtDNA genetic distances for predicting cross-species microsatellite amplification and polymorphism success in fishes. *Conservation Genetics* 9, 181-190.
- Csink, A.K., Henikoff, S. (1998): Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends in Genetics* 5, 200-204.
- 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.

- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. (1992): Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.
- di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B. (1994): Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91, 3166-3170.
- Dias, R.I., Santos, E.S.A., Macedo, R.H. (2009): Mating system and sexual conflict in the blue-black grassquit (*Volatinia jacarina*, Aves: Emberizidae): Extra-pair mating behavior sets the scene. Oecologia Brasiliensis 1, 183-191.
- 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.
- Ellegren, H. (2004): Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. Genetics 5, 435-445.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.-M. (2002): Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. Molecular Ecology 11, 1591-1604.
- Flegl, J. (2009): Evoluční biologie. 2. opravené a rozšířené vydání. Academia Praha.
- Forshaw, J. (1998): Encyclopedia of Birds. Weldon Owen Pty Limited.
- Fridolfsson, A.K., Gyllensten, U.B., Jakobsson, S. (1997): Microsatellite markers for paternity testing in the Willow warbler *Phylloscopus trochilus*: high frequency of extra-pair young in an island population. Hereditas 126, 127-132.
- Gaisler, J. (1997): Úvod do zoologie obratlovců. Masarykova Univerzita, Brno.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): Zoologie obratlovců. Druhé přepracované vydání. Academia, Praha.
- Goldstein, D.B., Schlotterer, C. (1999): Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, NY.
- Goncalves, E.C., Ferrari, S.F., Burlamaqui, T.C.T., Miranda, L., Santos, M.S., Silva, A., Schneider, M.P.C. (2010): Genetic diversity and differentiation of three Brazilian populations of Scarlet ibis (*Eudocimus ruber*). Journal of ornithology 4, 797-803.
- Gosler, A. (1994): Atlas ptáků světa. Příroda, Bratislava.

- Griffith, S.C., Owens, I.P.F., Thuman, K.A. (2002): Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* 11, 2195-2212.
- 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.
- Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C., Yuri, T. (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763-1768.
- Hancock, J.M. (1999): Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: *Microsatellites: Evolution and Application* (Goldstein, D.B., Schlötterer, C.), 1–9. Oxford University Press, Londýn, UK.
- Hanzák, J., Hudec, K. (1974): Světem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci. Albatros, Praha.
- 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.
- Hill, A., Green, M.C. (2011): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* 1, 13-15.
- Hoffman, J.I., Amos, W. (2005): Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* 14, 599-612.
- Huang, Q.-Y., Xu, F.-H., Shen, H., Deng, H.-Y., Liu, Y.-J., Liu, Y.-Z., Li, J.-L., Recker, R.R., Deng, H.-W. (2002): Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *The American Society of Human Genetics* 70, 625-634.
- 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* 11, 1211-1214.
- 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. *Conservation Genetics* 10, 1537-1539.
- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert, F.A.M. (2006): Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1-29.
- Churý, J., Crha, J., Fraňo, J. (1966): *Biologie se základy zoologie*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Ji, Y.-J., Liu, Y.-D., Ding, Ch.-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.
- Jones, A.G., Ardren, W.R. (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12, 2511–2523.
- 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.
- Kashi, Y., King, D.G. (2006): Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics* 22, 253-259.
- Kleven, O., Oigarden, T., Foyn, B.E., Moksnes, A., Roskaft, E., Rudolfson, G., Stokke, B.G., Lifjeld, J.T. (2007): Low frequency of extrapair paternity in the common redstart (*Phoenicurus phoenicurus*). *Journal of Ornithology* 148, 373-378.
- Koreth, J., O'Leary, J.J., McGee, J.O'D. (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis. *Journal of Patology* 178, 239-248.
- 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.
- Li, Y.-Ch., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11, 2453-2465.
- 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.
- Maak S., Neumann K., von Lengerken G., Gattermann R. (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics* 3, 233.

- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Masello, J.F., Sramkova, A., Quillfeldt, P., Epplen, J.T., Lubjuhn, T. (2002): *Genetic monogamy in burrowing parrots Cyanoliseus patagonus?* Journal of Avian Biology 33, 99-103.
- Mazura, I., Michalová, K., Brdička, R., Mácha, J. (2001): Speciální metody molekulární biologie. Nakladatelství Karolinum, Praha.
- McGuire, H.L., Noor, M.A.F. (2002): Microstellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidea, *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.
- Mohindra, V., Narain, L., Punia, P., Gopalakrishnan, A., Mandal, A., Kapoor, D., Ponniah, A.G., Lal, K.K. (2005): Microsatellite DNA markers for population-genetic studies of *Labeo dyocheilus*. Journal of Applied Ichthyology 21, 478-482.
- Nečas, O., Svoboda, A., Hejtmánek, M., Janisch, R., Červinka, M., Lenhart, K., Kolář, Z. (2000): Obecná biologie pro lékařské fakulty. 1. vydání. Nakladatelství H & H, Jinočany.
- Newman, R.A., Square, T. (2001): Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). Molecular Ecology Notes 10, 1087-1100.
- Obručová, E. (2009): Polymorfní DNA mikrosatelity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Carneiro Vieira, M.L. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology 29, 294-307.
- Olmos, F., Silva, R.S. (2001): Breeding biology and nest site characteristics of the Scarlet Ibis in Southeastern Brazil. Waterbirds 24, 58-67.
- 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.

- Petrie, M., Doums C., Møller, A.P. (1998): The degree of extra-pair paternity increases with genetic variability. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 95, 9390-9395.
- 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., Raudsepp, T., Chowdhary, B.P., Møller, A.P., Ellegren, H. (1997): Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* 7, 471-482.
- 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.
- Raclavský, V. (1998): Úvod do základních metod molekulární genetiky. UP v Olomouci, Olomouc.
- Rozeder, A. D., Marshall, R. K., Mitchelson, A. J. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology* 10, 1645-1656.
- Rosypal, S. (1997): Úvod do molekulární biologie. Díl první, díl třetí. Druhé rozšířené vydání. Brno.
- 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., Gonçalves, E.C., Barbosa, M.S.R., Silva, S., Schneider, M.P.C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae-Aves). *Molecular Ecology Notes* 6, 307-309.
- 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. In: Baker, A.J. (Ed.): *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Seutin, G., White, B.N., Boag, P.T. (1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69, 82-90.
- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365-371.

- Shephard, J.M., Galbusera, P., Hellemans, B., Jusic, A., Akhandaf, Y. (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics* 10, 1525-1528.
- Singer, M.F. (1982): Highly repeated sequences in mammalian genomes. *International Review of Cytology* 76, 67-112.
- Stai, S. M., Hughes, C. R. (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics* 34, 387-389.
- Subramanian, S., Madgula, V.M., George, R., Mishra, R.K., Pandit, M.W., Kumar, Ch.S., Singh, L. (2002): MRD: A microsatellite repeat database for prokaryotic and eukaryotic genomes. *Genome Biology* 3, 111-113.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V. (2005): *Metody molekulární biologie*. Vydavatelství MU, Brno.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): *Svět zvířat IV. Ptáci (1)*. Albatros, Praha.
- Tautz, D., Schlötterer, C. (1994): Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development* 4, 832-837.
- Taylor, E.B., Foote, Ch.J., Wood, C.C. (1996): Molecular genetic evidence for parallel life-history evolution within a pacific salmon (sockeye salmon and kokanee, *Oncorhynchus nerka*). *Evolution* 50, 401-416.
- Tomasulo-Seccomandi, A.M., Schable, N.A., Bryan, A.L., Jr., Brisbin, L.I., Jr., Lama del, 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.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- van den Bussche, R.A., Harmon, S.A., Baker, R.J., Bryan, A.L., Rodgers, J.A., 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.
- Veselovský, Z. (2001): *Obecná ornitologie*. Academia, Praha.
- Vrbatová, J. (2009): *Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u ibise rudého (Eudocimus ruber)*. Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Wattier, R., Engel, C.R., Saumitou-Laprade, P., Valero, M. (1998): Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci:

experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* 7, 1569-1573.

- Weber, J.L., Wong, C. (1993): Mutation of human short tandem repeat. *Human Molecular Genetics* 2, 1123-1128.
- Whittaker, J.C., Harbord, R.M., Bodalo, N., Mackay, I., Dawson, G., Sibly, R.M. (2003): Likelihood-Based Estimation of Microsatellite Mutation Rates. *Genetics Society of America* 164, 781-787.
- Wilson, R. (2008): Sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) – Modern symplex. Summer studentship 2007/2008. Massey University, Albany. Published online (awcmee.massey.ac.nz).
- Yeung, C.K.L., Hsu, Y.-Ch., Yao, Ch.-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.
- Zane, L., Bargelloni, L., Paternello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.
- Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, J. (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.