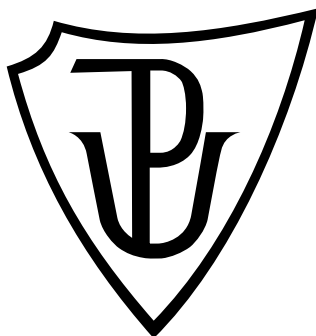


Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza a charakteristika polymorfních
cross-species mikrosatelitů pro determinaci paternity
u čápa černého (*Ciconia nigra*)**

Diplomová práce

Romana Cahlíková

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 6. května 2011

Chtěla bych poděkovat RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho odbornou pomoc, cenné rady, lidský přístup a čas, který mi během psaní této diplomové práce věnoval.

Souhrn

Tato diplomová práce byla zaměřena na nalezení nových polymorfních mikrosatelitů čápa černého (*Ciconia nigra*) a jejich charakteristiku. Pro studium DNA čápa černého byly použity *cross-species* páry primerů odvozené od příbuzných druhů ptáků, jelikož zatím nebyly publikovány žádné páry primerů, které by byly odvozeny přímo z DNA čápa černého.

V teoretické části této diplomové práce byla řešena následující problematika: systém řádu brodiví (Ciconiiformes), charakteristika řádu brodiví, taxonomické zařazení čápa černého, mikrosatelitové lokusy testované u čápa černého, všeobecná charakteristika mikrosatelitů, vazba mikrosatelitů na pohlavní chromozomy a také determinace paternity u ptáků.

V praktické části této diplomové práce bylo testováno celkem 218 *cross-species* mikrosatelitů. U 204 mikrosatelitů pocházejících od taxonomicky příbuzných druhů ptáků z řádu brodiví (Ciconiiformes), dlouhokřídlí (Charadriiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potáplice (Gaviiformes) a veslonoží (Pelecaniformes), bylo testováno, jestli jsou polymorfní také u čápa černého. Jedenáct z těchto mikrosatelitů poskytlo u čápa černého polymorfní PCR produkt. Dále bylo znovu otestováno celkem 14 mikrosatelitů, které byly polymorfní u čápa bílého, ale podle bakalářské práce Navrátilová (2009) poskytly u čápa černého monomorfní PCR produkt. Mezi těmito mikrosatelity byl nalezen jeden polymorfní lokus. Všechny polymorfní lokusy, které byly nalezeny v mé diplomové práci (12 polymorfních lokusů) a polymorfní lokusy nalezené v bakalářské práci Navrátilová (2009) (20 polymorfních lokusů), byly genotypovány na 24 nepříbuzných jedincích čápa černého. Dva mikrosatelity, které Navrátilová (2009) uvádí jako polymorfní, byly monomorfní. Celkem tedy bylo vygenotypováno 30 polymorfních mikrosatelitů a získány jejich charakteristiky pomocí programů Cervus 3.0.3 a Genepop 4.0.10. Dvacet pět z nich bylo autozomálních, zbylých 5 mikrosatelitů bylo vázáno na pohlaví (4 mikrosatelity byly vázány na Z chromozom, způsob vazby 5. mikrosatelitu na pohlaví je nejasný). Tři z těchto mikrosatelitů vázaných na pohlaví vykazovaly mezi sebou silnou vazbu.

Summary

This master thesis was focused on finding a new polymorphic microsatellites in the black stork (*Ciconia nigra*) and their characterization. To study DNA of the black stork were used cross-species pairs of primers, which were derived from related species of birds, because no pairs of primers for the black stork were derived and published yet.

In the theoretic part of this master thesis was described following topics: system of Ciconiiformes, characterization of Ciconiiformes, taxonomic classification of the black stork, microsatellite loci tested in the black stork, general chracterization of microsatellites, linkage of microsatellites on sex chromosomes and determination of paternity in birds.

In the practical part of this master thesis was tested 218 cross-species microsatellites. 204 microsatellites derived from taxonomically related species of birds belonging to the order Ciconiiformes, Charadriiformes, Phoenicopteriformes, Gaviiformes and Pelecaniformes was tested, if these microsatellites were also polymorphic in the black stork. Eleven of these microsatellites were in the black stork polymorphic. Then was retested 14 microsatellites that were polymorphic in the white stork, but in the bachelor thesis of Navratilová (2009), they were described in the black stork as monomorphic. Among these microsatellites was found one polymorphic locus. All polymorphic loci, which were found in my master thesis (12 polymorphic loci) and polymorphic loci found in the bachelor thesis Navratilová (2009) (20 polymorphic loci), were genotyped in 24 unrelated individuals of the black stork. Two microsatellites, which Navratilová (2009) identified as polymorphic, were monomophic. Totaly was genotyped 30 polymorphic microsatellite loci and obtained their charactcteristics using the software Cervus 3.0.3 and Genepop 4.0.10. Twenty five of these loci were autosomal, the remainig 5 microsatellites were sex-linked (4 microsatellites were Z-linked, sex-linkage of the fifth microsatellite was unclear). Three of these sex-linked microsatelittes showed strong linkage among them.

Obsah

1 Úvod.....	6
2 Cíle	7
3 Současný stav řešené problematiky.....	8
3.1 Řád brodiví	8
3.1.1 Systém a fylogeneze řádu brodiví.....	8
3.1.2 Čáp černý (<i>Ciconia nigra</i>)	10
3.1.2.1 Hnízdění.....	11
3.1.2.2 Geografické rozšíření.....	12
3.1.2.3 Mikrosatelitové lokusy testované u čápa černého	12
3.1.2.3.1 Nové mikrosatelity v řádu brodiví (<i>Ciconiiformes</i>)	15
3.1.2.3.2 Nové mikrosatelity v řádu veslonoží (<i>Pelecaniformes</i>).....	15
3.1.2.3.3 Nové mikrosatelity v řádu plameňáci (<i>Phoenicopteriformes</i>)	16
3.2 Mikrosatelity	17
3.2.1 Mikrosatelity vázané na pohlavní chromozomy	17
3.3 Determinace paternity u ptáků	18
3.3.1 <i>Exclusion</i>	18
3.3.2 <i>Categorical allocation</i>	19
3.3.3 <i>Fractional allocation</i>	19
3.3.4 <i>Full probability parentage analysis</i>	19
3.3.5 <i>Parental reconstruction</i>	20
3.3.6 <i>Sibship reconstruction</i>	20
4 Materiál a metody	21
4.1 Biologický materiál.....	21
4.2 Metody	21
4.2.1 PCR amplifikace mikrosatelitové DNA	21
4.2.2 Elektroforetická separace PCR produktů v polyakrylamidovém gelu.....	22
4.3 Chemikálie	24
4.4 Roztoky	25
4.5 Přístrojové vybavení	27
5 Výsledky	28
6 Diskuze	44
7 Závěr.....	52
8 Seznam použitých zkratk.....	53
9 Seznam použité literatury.....	54
10 Příloha	60

1 Úvod

Mikrosatelity patří díky svým ojedinělým vlastnostem mezi rozšířené markery, které nacházejí uplatnění v mnoha oblastech molekulární biologie. Slouží jako nezastupitelný nástroj studia genomu rostlinné i živočišné buňky. Využití mikrosatelitů je však mnohem širší. Tyto repetitivní sekvence DNA nacházejí uplatnění i při fylogenetických studiích populací nebo při analýze paternity. U živočichů, konkrétně u ptáků, je však v souvislosti s paradoxem C hodnoty malá velikost genomu i malé zastoupení mikrosatelitů v něm. Většina dosud známých ptačích mikrosatelitů pochází od druhů z řádu pěvců (Passeriformes), zatím jen málo mikrosatelitů bylo popsáno u druhů řádu brodiví (Ciconiiformes).

Tato diplomová práce se zabývá hledáním polymorfních mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*) s využitím *cross-species* párů primerů odvozených především od zástupců řádu brodiví (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes) a veslonoží (Pelecaniformes).

2 Cíle

1. Vypracování rešerše na téma analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*).
2. PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů s využitím *cross-species* primerů, které jsou známy od taxonomicky příbuzných druhů ptáků, za účelem zjištění jejich polymorfismu u čápa černého.
3. Genotypování polymorfních lokusů u dostatečného počtu jedinců čápa černého pro získání jejich charakteristik.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Řád brodiví

Do řádu brodiví (Ciconiiformes) jsou řazeni většinou velcí masožraví ptáci s dlouhýma nohama a protáhlým, štíhlým krkem. Mezi největší zástupce patří čáp bílý (*Ciconia ciconia*), který dosahuje hmotnosti 4 kg, rozpětí křídel kolem 2 m, k nejmenším zástupcům tohoto řádu se pak řadí bukáček malý (*Ixobrychus minutus*) o hmotnosti 0,14 kg a rozpětí křídel 0,5 m.

Při letu mají zástupci řádu brodiví nohy vždy natažené. Čápi, ibisi a kolpíci mají v letu krk natažený dopředu (marabu, který se vyznačuje mohutným zobákem, však létá s hlavou přitaženou). Všichni zástupci čeledi volavkovití létají s krkem esovitě prohnutým a hlavou přitaženou k lopatkám.

U zástupců řádu brodiví dochází většinou ve větší či menší míře k zakrnění hlasového ústrojí. Zástupci tohoto řádu často postrádají hlasové svaly, proto je například u mnohých zástupců čeledi čápoovití nahrazován hlas mechanickými zvuky, jako je klapání zobáku.

Většina zástupců tohoto řádu staví poměrně velká hnízda situovaná na stromech, na nichž hnízdí řadu let a stále je opravují. Materiálem pro jejich stavbu jsou klacky a větve. Někteří jedinci, kteří obývají rákosiny, staví hnízda každoročně nová a jako materiál pro stavbu jim slouží stébla rákosu. Mláďata, která na těchto hnízdech dospělci vyvádějí, jsou nidikolní. Zpravidla o ně pečují střídavě oba rodiči.

Potrava zástupců řádu brodiví je živočišná, její součástí jsou hlavně ryby, obojživelníci, drobní savci, hmyz a červi. Marabu africký je navíc svým mohutným zobákem, neopeřenou hlavou a krkem přizpůsoben k požívání mršin (Hudec *et al.*, 1994).

3.1.1 Systém a fylogeneze řádu brodiví

Prvotní studie, zabývající se rekonstrukcí řádu brodiví, byly založeny především na hodnocení morfologických a behaviorálních dat (Wood, 1984). Objev molekulárních technik, jako je například DNA-DNA hybridizace, restriční enzymová analýza, případně analýza mitochondriální DNA a také vývoj nových softwarů (PAUP) v posledních desetiletích, umožnily odhalit řadu nových poznatků, které vedly

k přehodnocení vzájemné fylogenetické příbuznosti různých druhů ptáků nejen v řádu brodiví (Sheldon & Slikas, 1997).

Řád brodiví je s největší pravděpodobností polyfyletický. První, kdo se touto otázkou zabývali, byli Parkes (v roce 1978) a Olson (v roce 1979), kteří předpokládali, že tento řád je heterogenní a zahrnuje čeledi čápoovití (Ciconiidae), člunozobcovití (Balaenicipitidae), ibisovití (Threskiornithidae), kladivoušovití (Scopidae), plameňákovití (Phoenicopteridae) a volavkovití (Ardeidae). Řada druhů patřících do tohoto řádu sdílela znaky i se zástupci řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), krátkokřídlí (Gruiformes), veslonoží (Pelecaniformes), vrubozobí (Anseriformes) a dravci (Falconiformes), což bylo hlavním důvodem, proč se autoři přikláněli k polyfyletickému původu řádu brodiví (Sheldon & Slikas, 1997).

Ve studii Hackett *et al.* (2008) je řešena fylogeneze řádu brodiví a veslonoží. Podle této studie je čeleď čápoovití v rámci fylogenetické rekonstrukce řazena do samostatné skupiny, zatímco zbylé 4 čeledi (člunozobcovití, ibisovití, kladivoušovití a volavkovití) jsou řazeny do skupiny společně s čeleděmi řádu veslonoží. V rámci této studie však autoři srovnávají i klasifikace řádu brodiví od tří dalších autorů. Zařazení zástupců řádu brodiví se však v těchto pracích liší. Pro odhalení co nejpřesnějších fylogenetických vztahů v řádu brodiví, tak bude nutné provést ještě řadu analýz.

Dle klasického systému se řád brodiví (Ciconiiformes) dělí do pěti čeledí: čápoovití (Ciconiidae), člunozobcovití (Balaenicipitidae), ibisovití (Threskiornithidae), kladivoušovití (Scopidae) a volavkovití (Ardeidae) (Hudec *et al.*, 1994).

Čeleď člunozobcovití (Balaenicipitidae) zahrnuje jediného zástupce a to člunozobce afrického (*Balaeniceps rex*). Jedná se o velkého, šedě zbarveného ptáka s krátkou chocholkou a člunu se podobajícím zobákem. Je rozšířen především v oblasti jižního Súdánu, západní Etiopie, Ugandy, jižního Zairu a Zambie.

V rámci čeledi kladivoušovití (Scopidae) je znám rovněž jen jediný zástupce, kladivouš africký (*Scopus umbretta*), jehož charakteristickým znakem je kladivovitý tvar hlavy. Tento pták je tmavě zbarven, podobá se čápovi, případně malé volavce. Vyskytuje se téměř po celé Africe (jižně od Sahary) (Reichholf & Steinbach, 2003).

Do čeledi ibisovití (Threskiornithidae) patří ibisové a kolpíci. Jedná se o středně velké ptáky, jejichž peří může být na hlavě, krku a kostrči prodlouženo. Zobák bývá dlouhý, tenký a ohnutý, případně zploštělý, na konci lžícovitě rozšířený.

Mezi zástupce čeledi volavkovitých (Ardeidae) patří bukači, bukáčci, kvakoši a volavky. Jedná se o nejpočetnější čeleď řádu brodivých. Zástupci této čeledi jsou

středně velcí nebo velcí ptáci. Mají dlouhé nohy a klínovitý, špičatý zobák, na jehož špičce se nacházejí jemné zoubky (Hudec *et al.*, 1994). Krk je díky prodloužení šestého obratle při letu esovitě zahnutý. Takovéto zahnutí krku umožňuje rovněž prudké vymrštění hlavy při lovu potravy, za kterou jim slouží například ryby, korýši a hmyz. Výrazným poznávacím znakem některých zástupců mohou být chocholka, či okrasná pera svatebního šatu (volavka stříbrná) (Hudec *et al.*, 1994; McKilligan, 2005).

V čeledi čápovití (Ciconiidae) je zastoupeno celkem 19 druhů poměrně velkých ptáků. Hlasové ústrojí těchto jedinců je zakrnělé, hlasové svaly a vole nejsou vytvořeny. Krk je při letu zcela natažen, čímž se liší například od zástupců čeledi Ardeidae. Mají 12 ručních letek, stejný počet rýdovacích per a 17-18 krčních obratlů. Vyskytují se u nich rudimentální slepá střeva a rudimentální penis. Živí se například rybami, obojživelníky, drobným hmyzem, marabu africký i mršinami. Většina zástupců této čeledi má kosmopolitní rozšíření, velká část druhů obývá oblast Afriky (Brown *et al.*, 1982; Hudec *et al.*, 1994). Mezi typické zástupce patří například čáp bělokrký (*Ciconia episcopus*), čáp bílý (*C. ciconia*), čáp černý (*C. nigra*), čáp simbil (*C. abdimii*), nesyť africký (*Mycteria ibis*), nesyť lesní (*M. americana*) nebo zejzob africký (*Anastomus lamelligerus*). V České republice žijí pouze dva druhy této čeledi a to čáp bílý a čáp černý (Hudec *et al.*, 1994; Reichholf & Steinbach, 2003).

3.1.2 Čáp černý (*Ciconia nigra*)

Taxonomické zařazení čápa černého je následující (Hudec *et al.*, 1994; Opatrný, 2003):

Kmen: Strunatci (Chordata)
Podkmen: Obratlovci (Vertebrata)
Třída: Ptáci (Aves)
Nadřád: Létaví (Neognathae)
Řád: Brodiví (Ciconiiformes)
Čeleď: Čápovití (Ciconiidae)
Rod: Čáp (*Ciconia*)

Čáp černý je poměrně velký pták o rozpětí křídel 1,5 m a hmotnosti okolo 3 kg (del Hoyo *et al.*, 1992). Tvarem těla se velmi podobá čápu bílému, narozdíl od něj však dosahuje menšího vzrůstu (Brown *et al.*, 1982). Samice i samci mají během období hnízdění uniformní vzhled. Svatební šat obou pohlaví čápa černého je černý,

s intenzivním zelenopurpurovým leskem. Na spodině těla, od prsou po spodní krovky ocasní a také v podpaží, je šat bílý. Zobák, oblast kolem očí, nahá kůže uzdičky i neopeřené části nohou jsou červené. V období mimo hnízdění je šat čápa černého identický s šatem svatebním, s výjimkou zobáku a nohou, které mají zbarvení hnědší. Pro mláďata čápa černého je charakteristický prachový šat. První a druhé prachové opeření juvenilních jedinců je bílé, na hřbetě našedlé, zobák je citrónově žlutý. Pozdější šat mláďat je nápadně podobný šatu dospělců, je ale hnědší, bez kovového lesku, pouze se slabším leskem na zádech a křídelních krovkách. Skoro všechna tmavá pera mají světle okrovou špičku. Zobák a nohy jsou zelenavě šedé (Hudec *et al.*, 1994). Jedinci čápa černého se vyskytují v lesích s tůněmi, řekami, případně mokřady v okolí, na rozdíl od čápa bílého, který vyhledává blízkost lidských obydlí (Vlachos *et al.*, 2008). Jako potrava jim slouží ryby, obojživelníci, hlemýždi, drobní plazi, savci, případně ptáci, které nabodávají na ostrý zobák (del Hoyo *et al.*, 1992; Svensson & Grant, 2004).

3.1.2.1 Hnízdění

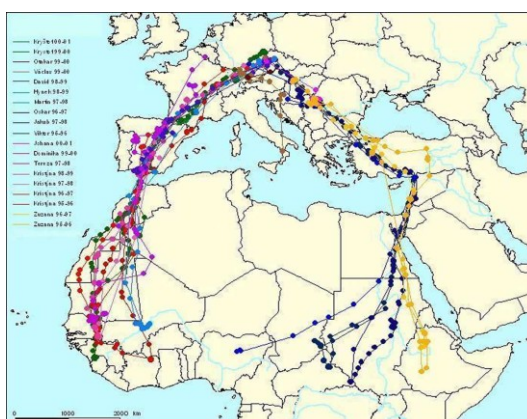
V období hnízdění se jedinci vyskytují v párech, mimo toto období je možné spatřit čápy černé i ve větších skupinách zahrnujících až desítky jedinců (Brown *et al.*, 1982). Hnízda stavějí na bočních větvích v korunách stromů v listnatých, smíšených, ale i jehličnatých lesích. Byla však pozorována i hnízda zbudovaná na skalách, ojediněle na zemi. Hnízda dosahují průměru 1,5 m, jsou tvořena z mechu, trávy, lišejníků, větviček a listů, které jsou stmelené pomocí hlíny. Na stavbě se podílejí oba jedinci z páru. Pro páry je typické, že se do hnízd opětovně vracejí i v následujících letech. Bylo zjištěno, že kromě budování vlastních hnízd mohou čápi černí využívat i hnízda dravců, jako jsou například orli, jestřábi, případně kánata. Na hnízdiště přilétají obvykle oba ptáci z páru současně. Krátce po přiletu dochází k námluvám, mezi jejichž projevy patří pokyvování hlavou nahoru a dolů, ze strany na stranu, zaujímání vypínacích postojů, vzájemné obcházení na hnízdě, přičemž dochází ke vztyčování bílé spodní krovky ocasní (del Hoyo *et al.*, 1992; Hudec *et al.*, 1994). Samice snáší do hnízda 3-4 vejce. Inkubační doba se obvykle pohybuje okolo 32-38 dní. O mláďata se stará vždy jeden z rodičů, zatímco druhý shání potravu pro mláďata. Ta jsou schopna letu 55.-60. den, zdržují se však na hnízdě až 73 dní. Sexuální zralosti dosahují po třetím roce života. Páry hnízdí izolovaně od ostatních jedinců. Snášení vajec probíhá

od začátku dubna až do začátku května. Mláďata jsou pak vyváděna v červenci a srpnu. Hnízdní oblasti čápa černého jsou roztroušeny téměř po celé České republice, např. v Jeseníkách, na Šumavě, v Orlických horách, Hrubém a Nízkém Jeseníku, Bílých Karpatech (del Hoyo *et al.*, 1992; Hudec *et al.*, 1994; Šťastný *et al.*, 2006).

3.1.2.2 Geografické rozšíření

Populace čápa černého jsou rozšířené jak v Palearktické oblasti (Evropa, sever Asie až po Himaláje, severní Afrika včetně Sahary a Kanárských ostrovů, sever a střed Arabského poloostrova), tak v oblasti jižní Afriky. Palearktické populace čápa černého migrují na zimu do Afriky, zatímco jihoafrické populace zůstávají v oblasti hnízdění celoročně (Brown *et al.*, 1982). Na základě studie prováděné v rámci projektu Africká odysea, bylo zjištěno, že evropské populace čápa černého putují do Afriky dvěma cestami, západní (přes Gibraltar) a východní (přes Turecko a Izrael). Příklad způsobu migrace zástupců čápa černého je uveden v Obrázku č. 1. Populace čápa černého žijící ve Francii, Belgii a západním Německu využívají k migraci západní cestu, čápi z východní Evropy a západního Ruska využívají východní cestu, zatímco populace čápů žijící ve východním Německu, Česku a Polsku migrují do Afriky oběma cestami. Dále bylo prokázáno, že někteří jedinci migrují do Afriky přes Itálii, Sicílii, Sardinii a Maltu (Bobek *et al.*, 2008). Asijské populace zimují v Indii a Číně (Elphick, 2008).

Obrázek č. 1: Migrační trasy zástupců čápa černého pocházejících z České republiky, kteří byli satelitně sledováni v rámci projektu Africká odysea (Bobek *et al.*, 2008).



3.1.2.3 Mikrosatelitové lokusy testované u čápa černého

U čápa černého nebyly doposud publikovány žádné práce, které by se zabývaly studiem mikrosatelitů izolovaných *de novo*. Prováděny byly pouze analýzy s již

existujícími páry primerů pomocí *cross-species* PCR amplifikace. Na toto téma byla zpracována zatím jedna bakalářská práce, v níž bylo metodou *cross-species* PCR amplifikace testováno celkem 177 párů primerů pocházejících od různých druhů vodních ptáků z řádu brodivých, plameňáků, potápek, veslonohých, vrubozobých, tučňáků a dokonce i jeden pár primerů od tura domácího (Navrátilová, 2009). Testovány byly mikrosatelity na DNA pocházející od šesti nepříbuzných jedinců čápa černého. V rámci těchto testovaných párů primerů bylo nalezeno 21 polymorfních lokusů (ve skutečnosti jen 20, jelikož bylo zjištěno, že mikrosatelity WSμ17 a WSμ18 jsou totožný lokus). Údaje o polymorfních lokusech získaných z této bakalářské práce jsou uvedeny v Tabulce č. 1. Díky této bakalářské práci bylo nalezeno celkem 16 polymorfních mikrosatelitů (ve skutečnosti jen 15, z důvodu již zmíněné totožnosti lokusů WSμ17 a WSμ18), které byly amplifikovány pomocí párů primerů původně navržených pro různé druhy ptáků z řádu brodiví (Ciconiiformes), jako jsou čáp bílý (*Ciconia ciconia*), ibis čínský (*Nipponia nippon*), ibis rudý (*Eudocimus ruber*), kolpík malý (*Platalea minor*), kolpík růžový (*Ajaia ajaja*) a nesyt lesní (*Mycteria americana*). Dále byly nalezeny 3 polymorfní mikrosatelity, které byly amplifikovány pomocí párů primerů pocházejících od zástupců z řádu veslonoží (Pelecaniformes), konkrétně páry primerů pocházející od kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*) a pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*). Páry primerů odvozené od zástupců z řádu tučňáci (Sphenisciformes) a vrubozobí (Anseriformes) umožnily každý amplifikaci jednoho polymorfního lokusu. Jednalo se o páry primerů, které byly odvozené od tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*) a kachny divoké (*Anas platyrhynchos*). V rámci bakalářské práce Navrátilová (2009) byly testovány nejen páry primerů odvozené od výše zmíněných druhů, ale použito bylo i mnoho dalších párů primerů pocházejících od kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a volavky velké (*Ardea herodias*) z řádu brodiví (Ciconiiformes), o páry primerů od kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*) a pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) z řádu veslonoží (Pelecaniformes), páry primerů, které byly odvozené od plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) z řádu plameňáci (Phoenicopteriformes), páry primerů odvozené od kajky mořské (*Somateria mollissima*), kachnice laločnaté (*Bizura lobata*) a pižmovky velké (*Cairina moschata*) z řádu vrubozobí (Anseriformes), o páry primerů od potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*) z řádu potápky (Podicipediformes) a v neposlední řadě i o jeden pár primerů od pratura indického (*Bos indicus*) z řádu

sudokopytníci (Artiodactyla). Všechny tyto výše zmíněné páry primerů však u čápa černého poskytly monomorfní PCR produkt.

Tabulka č. 1: Charakteristika polymorfních mikrosatelitových lokusů detekovaných u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého (Navrátilová, 2009).

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus (počet alel)
Brodívi (Ciconiiformes)	Čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)	Cc02 (4)
		Cc04 (6)
		Cc07 (4)
	Ibis čínský (<i>Nipponia nippon</i>)	Nn12 (4)
	Ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Eru03 (3)
		Eru04 (4)
	Kolpík malý (<i>Platalea minor</i>)	PM1-17 (3)
		PM2-28 (3)
		PM2-62 (3)
		PM3-13 (2)
	Kolpík růžový (<i>Ajaia ajaja</i>)	Aaju4 (4)
	Nesyt lesní (<i>Mycteria americana</i>)	WS4 (2)
		WSμ17*(4)
		WSμ18*(3)
		WSμ20 (4)
		WSμ24 (2)
Veslonozí (Pelecaniformes)	Kormorán galapážský (<i>Phalacrocorax harrisi</i>)	PhD11 (4)
	Pelikán severoamerický (<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>)	PeEr 06 (2)
		PeEr09 (4)
S	Tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	AM13 (4)
A	Kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APH 13 (2)

Vysvětlivky: A...Vrubozobí (Anseriformes); S...Tučňáci (Sphenisciformes);
*...Mikrosatelitové lokusy WSμ17 a WSμ18 amplifikují stejný mikrosatelitový lokus. Autorka však uvádí odlišný počet alel.

Výzkumný tým z německé univerzity ve Freiburgu objevil, v rámci řádu brodiví, 6 nových mikrosatelitů (CC1, CC3, CC7, CC9, CC10 a CC13) u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Dva z těchto mikrosatelitů (CC1 a CC9) pak byly detekovány v rámci studie DNA čápa černého jako polymorfní (Segelbacher, osobní sdělení). Žádný z těchto mikrosatelitových lokusů však zatím nebyl publikován.

Další práce zabývající se studiem DNA čápa černého zatím nejsou známy. S přihlédnutím na taxonomický původ druhů, od kterých polymorfní mikrosatelity testované v bakalářské práci Navrátilová (2009) pocházely, by bylo vhodné otestovat i nové mikrosatelity pocházející od dalších zástupců z řádu brodiví (Ciconiiformes), veslonozí (Pelecaniformes) a plameňáci (Phoenicopteriformes), které byly popsány po dokončení práce Navrátilová (2009), jelikož je velká pravděpodobnost, že mezi těmito testovanými mikrosatelity budou nalezeny nové polymorfní lokusy.

3.1.2.3.1 Nové mikrosatelity v řádu brodiví (Ciconiiformes)

V rámci řádu brodiví byly nově publikovány pouze mikrosatelity pocházející od dvou druhů z čeledi volavkovití (Ardeidae). Hill & Green (2011) ve své studii uvádějí 12 nových polymorfních lokusů, nalezených při studiu 31 jedinců volavky červenavé (*Egretta rufescens*), pocházejících z kolonií v Texasu. Dalším zástupcem z čeledi Ardeidae je volavka žlutozobá (*Egretta eulophotes*). Pro ni bylo v práci Huang *et al.* (2010) nalezeno při testování 20 jedinců, z provincie Fujian v Číně, celkem 18 polymorfních mikrosatelitů. Páry primerů odvozené od těchto mikrosatelitových lokusů byly dále použity pro *cross-species* PCR amplifikaci DNA pěti různých druhů ptáků (*A. albus*, *A. bacchus*, *B. ibis*, *E. garzetta* a *E. sacra*). Autoři v této práci uvádějí pouze procento úspěšnosti *cross-species* amplifikace, to je-li výsledný PCR produkt u daných pěti druhů ptáků polymorfní či nikoliv, však v této práci uvedeno není.

3.1.2.3.2 Nové mikrosatelity v řádu veslonozí (Pelecaniformes)

V rámci řádu veslonozí (Pelecaniformes) byly nalezeny polymorfní mikrosatelity u jednoho druhu z čeledi faetonovití (Phaethontidae), jednoho druhu z čeledi fregatkovití (Fregatidae), dvou druhů z čeledi kormoránovití (Phalacrocoracidae) a tří druhů z čeledi terejovití (Sulidae).

Humeau *et al.* (2010) našli v rámci rádu veslonoží celkem 11 nových polymorfních mikrosatelitů u faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*), zástupce čeledi faetonovití (Phaethontidae).

U fregatky obecné (*Fregata minor*) z čeledi fregatkovití (Fregatidae) bylo testováním 23 jedinců z populací žijících na Havaji nalezeno v rámci práce Dearbon *et al.* (2008) celkem 18 polymorfních mikrosatelitů.

V čeledi kormoránovití (Phalacrocoracidae) byly nalezeny polymorfní mikrosatelity u dvou druhů. U kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), byly publikovány celkem 2 studie, v nichž byly nalezeny polymorfní mikrosatelity. Fike *et al.* (2009) našli testováním 31 zástupců kormorána ušatého celkem 24 polymorfních mikrosatelitů. Další 8 polymorfních mikrosatelitů pro kormorána ušatého bylo nalezeno v rámci práce Mercer *et al.* (2010). Druhým studovaným zástupcem této čeledi byl kormorán chocholatý (*Phalacrocorax aristotelis*), u něhož našli autoři Barlow *et al.* (2010) celkem 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Faircloth *et al.* (2009) našli celkem 11 nových polymorfních lokusů u tereje modronohého (*Sula nebouxii*). Další práci zabývající se studiem DNA tohoto zástupce z čeledi terejovití (Sulidae) byla práce Taylor *et al.* (2010), v níž bylo testováno celkem 10 párů primerů odvozených od tereje modronohého a tereje guánového (*Sula variegata*). Osm z těchto párů primerů umožnilo amplifikaci polymorfního PCR produktu u tereje modronohého a amplifikaci devíti polymorfních PCR produktů u tereje guánového. V práci Morris-Pocock *et al.* (2010), která byla zaměřena na studium DNA tereje červenonohého (*Sula sula*), našli autoři celkem 15 polymorfních lokusů. V rámci této práce pak bylo vybráno 11 párů primerů, které poskytly polymorfní PCR produkt u tereje červenonohého a tyto páry primerů byly použity pro *cross-species* PCR amplifikaci u tereje modronohého a tereje guánového.

3.1.2.3.3 Nové mikrosatelity v rádu plameňáci (Phoenicopteriformes)

V rámci rádu plameňáci byly objeveny mikrosatelitové lokusy od plameňáka růžového (*Phoenicopus roseus*) z čeledi plameňákovití (Phoenicopteridae) (Geraci *et al.*, 2010). V jejich práci bylo popsáno celkem 37 polymorfních mikrosatelitů.

3.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity, neboli STRs/SSRs (short tandem repeats/single sequence repeats), patří mezi repetitivní sekvence DNA, které jsou součástí tzv. VNTRs lokusů (variable number of tandem repeats). Nacházejí se jak v kódujících, tak i nekódujících (zde převážně) oblastech eukaryotního genomu. Jak již jejich samotný název napovídá, jedná se o krátké tandemové repetice o délce repetitivní jednotky 1-6 bp (Goldstein *et al.*, 1995; Ellegren *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2006). Dle typu opakující se sekvence je lze rozdělit na dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené. Podle délky repetice se pak rozdělují na mono-, di-, tri-nukleotidové sekvence a podobně (Ellegren, 1992; Oliveira *et al.*, 2006). Mikrosatelity se vyznačují vysokou mutační rychlostí 10^{-3} - 10^{-4} (vztaženo na lokus a generaci), vysokým polymorfismem, kodominancí, variabilní povahou a vysokou heterozygotností. Dědí se na základě zákonů Mendelistické dědičnosti a díky svým jedinečným vlastnostem nacházejí uplatnění jako molekulární markery při testech paternity, v populačních a evolučních studiích a rovněž se využívají při genetickém mapování (FitzSimmons *et al.*, 1995; Ellegren *et al.*, 1997; Garza & Williamson, 2001; Cadrin *et al.*, 2005).

3.2.1 Mikrosatelity vázané na pohlavní chromozomy

Většina doposud nalezených a testovaných mikrosatelitů ptáků se nachází na autozomech a jen u malé části dosud popsáných mikrosatelitů byla prokázána jejich vazba na pohlavní chromozomy. Mezi dosud objevené mikrosatelity vázané na pohlaví, tzv. *sex-linked*, patří například polymorfní mikrosatelit Pro86, jehož zdrojovým druhem je cukernatka kapská (*Promerops cafer*) nebo 4 polymorfní mikrosatelitové lokusy (Emb79, Emb84, Emb107 a Emb117), které byly prvotně popsány u strnada rákosního (*Emberiza schoeniclus*), z řádu pěvců (Passeriformes). Všechny tyto výše zmíněné mikrosatelitové lokusy jsou vázány na chromozom Z (Feldheim *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2008).

Vykazují-li mikrosatelitové lokusy vazbu na pohlavní chromozom Z, pak jsou všechny testované samice homozygotní (hemizygotní), zatímco testovaní samci mohou mít jak homozygotní, tak heterozygotní konstituci alel (Griffith *et al.*, 1998; Fridolfson & Ellegren, 1999; Mayer *et al.*, 2008). Vazba mikrosatelitů na pohlavní chromozomy, případně na autozomy se ovšem v průběhu evoluce může měnit. Ve studii Brooke *et al.* (2010) byl popsán případ, kdy v důsledku efektu hrdla lahve u skřivana razoského,

někdy též uváděného jako skřivana kapverdského (*Alauda razae*) došlo k translokaci mikrosatelitových lokusů z autozomů na pohlavní chromozomy. Tímto způsobem totiž může podle autorů dojít k zachování určitého stupně diverzity i v poměrně malých populacích.

3. 3 Determinace paternity u ptáků

V rámci třídy Aves existuje hned několik způsobů soužití. Někteří ptáci upřednostňují polygamii, jiní pak polyandrii, případně monogamii. V rámci monogamně žijících párů je však nutné rozlišovat monogamii sociální a monogamii sexuální (Bollmann & Reyer, 1999). V řadě případů jsou samci či samice ptáků sice sociálně monogamní a vychovávají spolu mláďata, to však nevylučuje, aby samice měla potomky i s jinými samci (například z důvodu zlepšení genového fondu potomků), případně aby samec kopuloval s jinými samicemi (Reid *et al.*, 2011). V případě mimopárové kopulace (EPC) samice, s jiným samcem než je hnízdní partner, může dojít k mimopárové fertilizaci (EPF) a následnému narození mimopárových mláďat (EPY) (Kempnaers *et al.*, 1992). K odhalení těchto mimopárových potomků slouží řada metod umožňujících analýzu paternity. Paternitní analýzy nacházejí uplatnění například v oblastech molekulární a behaviorální ekologie a neméně důležitou roli zastávají i při zodpovídání mnoha evolučních otázek. V minulosti byly analýzy paternity založeny například na elektroforetické separaci allozymů, případně na DNA fingerprintingu. V současné době se však pro analýzu paternity ve velké míře využívají data získaná pomocí analýzy mikrosatelitů, která se následně statisticky zpracovávají. Existuje celkem 6 statistických metod, tzv. *categorical allocation*, *exclusion*, *fractional allocation*, *full probability parentage analysis*, *parental reconstruction* a *sibship reconstruction* (Jones & Arderon, 2003). V posledních letech rovněž došlo k rozvoji počítačových softwarů umožňujících paternitní analýzy, mezi které patří například programy Cervus, Gerud, Parente, Pedigree a mnoho dalších (Cercueil *et al.*, 2002; Jones, 2005; Kalinowski *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2010).

3.3.1 Exclusion

Tato metoda je založena na velmi jednoduchém principu. Na základě pravidel Mendelistické dědičnosti mláďata musí mít vždy alespoň 1 alelu daného

mikrosatelitového lokusu společnou s matkou a jednu alelu mikrosatelitového lokusu společnou s otcem. Poté, co je určen genotyp matky, potenciálních otců a mláďat, dojde k jejich vzájemnému porovnání. V případě nepřítomnosti společné alely potenciálního rodiče s mládětem je usuzováno, že dané mládě není biologickým potomkem tohoto jedince a tudíž může být tento jedinec z řady potenciálních rodičů vyřazen. Tímto způsobem se porovnávají i další genotypy potenciálních rodičů s genotypy mláďat, do doby, než jsou nalezeni mezi kandidátními jedinci biologičtí rodiče daného mláděte, kteří se shodují se svým potomkem alespoň v jedné alele. Problémy v identifikaci rodičů pomocí metody *exclusion* mohou nastat v případě, kdy z důvodu mutací sledovaného lokusu nebo přítomností nulových alel dojde k chybnému vyhodnocení genotypů studovaných jedinců (Jones & Arderen, 2003; Herlin *et al.*, 2007).

3.3.2 Categorical allocation

V situaci, kdy i přes použití *exclusion* metody zůstalo více potenciálních rodičů mláďat, se přistupuje k metodě *categorical allocation*. V tomto případě je pomocí výpočtů stanovena pravděpodobnost, s jakou by kandidátní jedinci mohli být biologickými rodiči a testovaná mláďata jsou poté přiřazena k tomu jedinci (páru jedinců), u něhož byla hodnota pravděpodobnosti biologického rodičovství nejvyšší (Jones & Arderen, 2003; Jones *et al.*, 2010).

3.3.3 Fractional allocation

U této metody se postupuje prakticky stejně jako v metodě *categorical allocation*. V tomto případě však není mládě přiřazeno pouze k jednomu z potenciálních rodičů (nebo rodičovskému páru), ale dochází k jeho částečnému přiřazení ke všem potenciálním rodičům, kteří připadají v úvahu, a to na základě jejich relativní pravděpodobnosti být biologickým rodičem daného mláděte (Jones *et al.*, 2010).

3.3.4 Full probability parentage analysis

Většina metod využívaných pro parentální analýzy pracuje pouze s genetickými daty. Metoda *full probability parentage analysis* se však od těchto metod poněkud odlišuje. V rámci parentální analýzy jsou totiž kromě genetických dat do statistického

zpracování zahrnutý i údaje o prostorové lokalizaci zkoumaných jedinců, různá behaviorální a další data. Díky tomuto komplexnímu zpracování všech relevantních dat o studovaném souboru jedinců se podstatně zvýší šance správného vyhodnocení výsledků (Hadfield *et al.*, 2006; Jones 2010).

3.3.5 Parental reconstruction

Tato metoda využívá genotypů mláďat, která jsou v úplném nebo částečném příbuzenském vztahu, pro rekonstrukci genotypu rodičů. Podmínkou pro úspěšnou parentální rekonstrukci je však to, aby všechna studovaná mláďata měla společného alespoň jednoho z rodičů. Pak lze na základě znalosti genotypu mláďat určit i genotyp rodičů. Tato metoda je velmi výpočetně náročná. Navíc má i své nevýhody. Jednou z nich je nutnost využívat vysoce polymorfní markery. Dalším problémem, který se v rámci této metody objevuje, je klesající úspěšnost parentální rekonstrukce v závislosti na zmenšujícím se počtu testovaných mláďat. Proto je tato metoda u ptáků špatně aplikovatelná (Jones & Ardren, 2003; Jones, 2005; Jones *et al.*, 2010).

3.3.6 Sibship reconstruction

V případě, že nejsou k dispozici vzorky rodičů, ale známá je pouze skupina mláďat v potenciálně příbuzenském vztahu, přichází na řadu *sibship* rekonstrukce (Painter, 1997; Jones *et al.*, 2010). Díky této metodě je skupina potomků rozdělena do tří příbuzenských tříd (do skupiny jedinců v plném příbuzenském vztahu, v částečném příbuzenském vztahu a do skupiny jedinců, které nebylo možno zařadit). Jakmile jsou mláďata takto rozdělena, mohou být rekonstruovány jejich genotypy a může proběhnout vlastní paternitní analýza (Jones *et al.*, 2010).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V této diplomové práci byly použity vzorky krve, které byly odebrány vybraným jedincům čápa černého (*Ciconia nigra*), hnízdícím volně na území celé České republiky. Odebírání vzorků krve probíhalo v letech 2003-2005. Tyto odběry provedl v rámci své disertační práce Mgr. Radek Hampl. Mláďatům z hnízd bylo z brachiální žíly odebráno přibližně 20-50 μ l krve. Krev byla následně uchovávána v Queen's pufru (Seutin *et al.*, 1991) a skladována v lednici při 4 °C po dobu, než byla použita pro izolaci DNA, pomocí fenol-chloroformové metody. Následně byla změřena koncentrace vyizolované DNA a po naředění na vhodnou koncentraci (20-50 μ g/ml) byla uchována v mrazáku při -20 °C. Pro zajištění vzájemné nepříbuznosti testovaných jedinců byl pro laboratorní analýzy vybrán krevní vzorek vždy jen jednoho mláděte z hnízda.

Jelikož pohlaví jedinců nebylo známo, bylo v Laboratoři populační genetiky, na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci provedeno určení pohlaví pomocí PCR amplifikace DNA.

4.2 Metody

4.2.1 PCR amplifikace mikrosatelitové DNA

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

Storage Buffer A (50 mmol/l Tris-HCl, pH 8, 100 mmol/l NaCl, 0,1 mol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 50% glycerol, 1% Triton X-100) (10x)	6,7 μ l
Roztok $MgCl_2$ o koncentraci 25 nmol/l	4,0 μ l
Roztok dNTPs o koncentraci 20 μ mol/l	0,7 μ l
Primer A o koncentraci 10 μ mol/l	3,3 μ l
Primer B o koncentraci 10 μ mol/l	3,3 μ l
<i>aTaq</i> DNA polymeráza 5 U/ μ l	1,0 μ l
Deionizovaná voda	44,7 μ l

Po napipetování všech složek se mikrozkušavka důkladně zvertexuje a zcentrifuguje. Takto připravený PCR mix se dále rozpipetuje po 9 μ l do mikrozkušavek s již napipetovaným 1 μ l roztoku DNA. Následně se vzorky umístí do termocykleru a zvolí se vhodný program PCR reakce.

Základní teplotní a časové podmínky PCR reakce:

1) 94°C	5 min	
2) 94°C	30 s	} 35x
50°C	30 s	
72°C	30 s	
3) 72°C	7 min	
4) 10°C	do vyjmutí vzorků	

4.2.2 Elektroforetická separace PCR produktů v polyakrylamidovém gelu

- 1) Elektroforetická separace PCR produktů probíhá v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek. Gel se připravuje mezi dvě skla o rozměrech 330 x 390 mm a 330 x 420 mm, tloušťka gelu činí 0,4 mm. Tato separace se dále provádí ve vertikální vyhřívané elektroforetické komoře S2 (Whatman Biometra).
- 2) Po důkladném omytí obou skel vodou a následném očištění 96% ethanolem, se plocha většího skla, která se bude dotýkat gelu, ošetří přípravkem pro odpuzování vody. Plocha menšího skla, která se bude dotýkat gelu, se ošetří molekulárním lepidlem.
- 3) Po zaschnutí aplikovaných látek se větší sklo opláchne 2x deionizovanou vodou, menší sklo 4x 96% ethanolem. Následující kroky jsou již prováděny pouze v digestoři.
- 4) Na ošetřenou plochu většího skla se umístí 2 spacers. Po přiložení menšího skla, ošetřenou plochou dolů, pak vznikne prostor pro nalití gelu. V místě spacerů se navíc obě skla sepnou čtyřmi klipy.
- 5) Dále se do prostoru vzniklého mezi skly aplikuje připravený 6% polyakrylamidový gel. Po rovnoměrném rozprostření gelu po celé ploše mezi skly, se v místě plnění zasune hřebínek (rovnou stranou, 0,7 cm hluboko), který se připevní čtyřmi klipy. Poté se gel nechá hodinu polymerizovat.

- 6) Po ztuhnutí gelu se skla omyjí, očistí od přebytečného polyakrylamidu a osuší. Poté se vloží do elektroforetické komory a připevní pomocí šroubovacích úchytů.
- 7) Následně se do anodového i katodového prostoru nalije 0,5 x TBE pufr, odstraní se hřebínek, prostor mezi skly se očistí a promyje. Gel se nechá nahřívát při 90 W, 3000 V a 150 mA, zhruba 30 minut.
- 8) Po předeřtání gelu se komora odpojí od zdroje, znovu se propláchne prostor mezi skly, nasadí se hřebínek (1 mm hluboko, zoubky směřují do gelu). Do mezer mezi zoubky se nanese příslušné vzorky. Do těchto vzorků je před nanesením přidáno 5 μ l nanášecího pufru a takto připravené vzorky se nechají denaturovat v termocykleru při teplotě 96 °C, po dobu tří minut. Poté se vloží do ledové tříště a nanese do gelu po 2 μ l. Před každým novým nanášením je nutné použité špičky propláchnout v 0,5x TBE pufru. Po napipetování všech vzorků se komora připojí opět ke zdroji a vzorky nanesené v gelu se nechají separovat při nastavených hodnotách 70 W, 3000 V a 150 mA.
- 9) Po uplynutí doby nutné pro separaci jednotlivých vzorků se komora odpojí od zdroje, 0,5x TBE pufr se vypustí a skla s gelem se vyjmou. Poté se z gelu odstraní hřebínek a spacers. Skla se od sebe oddělí pomocí nože. Menší sklo s gelem se následně ponoří na 20 minut do lázně, s fix/stop roztokem, umístěné na třepačce.
- 10) Po 20 minutách se fix/stop roztok slije zpět do baňky a sklo se 3x promyje deionizovanou vodou. Sklo s gelem se opět umístí na třepačku a zalije 1% roztokem HNO_3 , jež se nechá působit 5 minut. Poté se roztok slije, sklo se 4x opláchne deionizovanou vodou a zalije roztokem AgNO_3 s přídavkem 1,2 ml formaldehydu, sklo ponořené v roztoku AgNO_3 je opět vloženo na třepačku.
- 11) Po 30 minutách se roztok AgNO_3 slije do zásobní láhve, sklo se opláchne deionizovanou vodou a umístí do misky na třepačce, kde se zalije předem vychlazenou vývojkou, do níž se těsně před použitím přidá 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
- 12) Po zalití gelu vývojkou dojde k vizualizaci PCR produktů, v případě jsou-li jednotlivé bandy dostatečně zřetelné, následuje zalití gelu fix/stop roztokem, čímž dojde k zastavení reakce.
- 13) Posledními kroky jsou vyjmutí gelu z lázně, jeho opláchnutí v deionizované vodě, usušení v sušárně a následné vyhodnocení.

4.3 Chemikálie

- Akrylamid (Serva)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/μl), (Promega, M1241)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (100 mmol/l, 400 μl každý), (Promega, U1240)
- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný – Na₂EDTA (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina – EDTA (Lachema)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)
- Kyselina chlorovodíková – 35% roztok (Lachema)
- Kyselina octová – ledová (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Methylenová modř (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)
- N,N' - methylenbisakrylamid (Serva)
- N,N,N',N' - tetramethyletylendiamin (TEMED) (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Přípravek pro odpuzování vody (Clear Vue Rain Repellent, Turtle WAX)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan - Tris (Applichem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Applichem)

4.4 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
- 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

Fix/stop roztok

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

Hydroxid sodný NaOH (1 mol/l) - roztok

- 40 g hydroxidu sodného
- doplnit deionizovanou vodou do 1 l

Molekulární lepidlo

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

Nanášecí pufr pro vzorky v polyakrylamidovém gelu

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

Peroxodisíran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ – 10% roztok

- 1 g peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- rozpustit v 10 ml deionizované H_2O
- uchovávat v lednici ve 4 °C

Polyakrylamidový 6% gel

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400 μl 10% roztoku peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- 40 μl N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu

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

Roztok 1% kyseliny dusičné HNO_3

- 12 ml 65% HNO_3
- objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml

TBE pufr – 10 x zásobní roztok

- 108 g Tris (trishydroxymethylaminomethanu)
- 55 g kyseliny borité H_3BO_3
- 40 ml roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Vývojka

- 24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3
- objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml
- uložit ve 4 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

4.5 Přístrojové vybavení

- elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)
- elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- hybridizační pec Hybridiser HB-2D (Techne)
- chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- laboratorní váhy Mark S 622 (BelEngineering)
- vyhřívaná magnetická míchačka s regulací otáček a teploty MR Hei-Combi (Heidolph)
- mikropipety Finnpiquette 0,5-10 µl (osmikanálová) a 0,3-1000 µl (ThermoLabsystem)
- mikropipety Nichipipet EX 0,5-1000 µl (Nichiryo)
- mikrocentrifuga CLE CSQSP (Cleaver Scientific Ltd)
- minicentrifuga Spectrafuge Mini (Labnet)
- negatoskop NSKR1 (Maneko)
- sekvenační elektroforetické komory S2 (Whatman Biometra)
- sušárna HS 122A (Chirana)
- termocykler PTC 100 (MJ Research)
- termocykler XP Thermal Cycler (BIOER technology)
- termostat digitální Dry Bath (Labnet)
- třepačka Orbit 1900 (Labnet International)
- vortex MS2 Minishaker (Ika)
- výrobce deionizované a ultračisté vody, typ 02 (AquaOsmotic)
- výrobce ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5 Výsledky

6 Diskuze

7 Závěr

- 1) Ve své diplomové práci jsem otestovala na DNA čápa černého (*Ciconia nigra*) celkem 204 *cross-species* párů primerů, které byly primárně navrženy pro amplifikaci mikrosatelitů u ptáků z řádu brodiví, dlouhokřídlí, plameňáci, potáplice a veslonoží.
- 2) Na základě výsledků testů prováděných v rámci souběžně probíhající diplomové práce Bc. E. Obručové (Obručová, osobní sdělení), zabývající se studiem DNA čápa bílého (*Ciconia ciconia*), jsem retestovala 14 mikrosatelitů, které byly v bakalářské práci Navrátilová (2009) detekovány jako monomorfní. Nalezla jsem mezi nimi 1 polymorfní PCR produkt.
- 3) Vygenotypovala jsem celkem 30 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Pro genotypizaci jsem použila DNA 24 nepříbuzných jedinců čápa černého.
- 4) Pomocí softwarů Cervus 3.0.3 a Genepop 4.0.10, jsem získala charakteristiky těchto polymorfních mikrosatelitů.
- 5) Mezi 30 polymorfními mikrosatelitovými lokusy jsem našla 5 mikrosatelitů, které vykazovaly vazbu na pohlaví (z toho 4 byly jasně vázány na Z chromozom), mezi 3 z těchto 5 mikrosatelitů jsem pak našla silnou vazbu.
- 6) Vybrala jsem 6 mikrosatelitů pro co nejrychlejší, finančně relativně nenáročnou, ale spolehlivou molekulární determinaci paternity u čápa černého.

8 Seznam použitých zkratek

bp	pár bází (<i>base pair</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
DTT	dithiothreitol
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
EPC	mimopárová kopulace (<i>extra-pair copulation</i>)
EPF	mimopárové oplození (<i>extra-pair fertilization</i>)
EPY	mimopárové mládě (<i>extra-pair young</i>)
H _{Exp}	očekávaná heterozygtnost (<i>expected heterozygosity</i>)
H _{Obs}	pozorovaná heterozygotnost (<i>observed heterozygosity</i>)
Na ₂ EDTA	ethylendiaminotetraoctan sodný
PAA	polyakrylamid
PCR	polymerázová řetězová reakce
PIC	průměrná zjištěná vypovídací hodnota mikrosatelitu (<i>polymorphic information content</i>)
SSRs	mikrosatelity (<i>short tandem repeats</i>)
STRs	mikrosatelity (<i>single sequence repeats</i>)
T _a	teplota annealingu (<i>annealing temperature</i>)
TEMED	N,N,N',N' – tetramethyletylendiamin
Tris	trishydroxymethylaminomethan
VNTRs	tandemové repetice (<i>variable number of tandem repeats</i>)

9 Seznam použité literatury

- Barlow, E.J., Telford, A., Daunt, F. & Cavers, S. (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. Molecular Ecology Resources, preprint.
- Bobek, M., Hampl, R., Peške, L., Pojer, F., Šimek, J. & Bureš, S. (2008): African Odyssey project - satellite tracking of black storks *Ciconia nigra* breeding at a migratory divide. Journal of Avian Biology (39), 500-506.
- Bollmann, K. & Reyer, H.-U. (1999): Why does monogamy prevail in the Alpine Water Pipit? In: Adams, N.J. & Slotow, R.H. (eds) Proc. 22 Int. Ornithol. Congr., Durban: 2666-2688. Johannesburg: BirdLife South Africa.
- Brooke, M. de L., Welbergen, J.A., Mainwaring, M.C., van der Velde, M., Harts, A.M. F., Komdeur, J. & Amos, W. (2010): Widespread translocation from autosomes to sex chromosomes preserved genetic variability in an endangered lark. Journal of Molecular Evolution (70), 242-246.
- Brown, L.H., Urban, E.K. & Newman, K. (1982): The birds of Africa, Vol. 1, Academic Press, London.
- van den Bussche, R.A., Harmon, S.A., Baker, R.J., Bryan, A.L., Jr., Rodgers, J.A., Jr., Harris, M.J. & Brisbin, I.L., Jr. (1999): Low levels of genetic variability in north american populations of the wood stork (*Mycteria americana*). The Auk (116), 1083-1092.
- Cadrin, S.X., Friedland, K.D. & Waldman, J.R. (2005): Stock identification methods: application in fishery science. Elsevier Academic Press, London.
- Cercueil, A., Bellemain, E. & Manel, S. (2002): Program for Parentage Analysis. Journal of Heredity (6), 458-459.
- Dearborn, D.C., Fleischer F.H. & Fleisher, R.C. (2008): Microsatellite primers relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). Molecular Ecology Resources (8), 1399-1401.
- 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.
- Ellegren, H., Moore, S., Robinson, N., Byrne, K., Ward, W. & Sheldon, B.C. (1997): Microsatellite evolution – A reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Molecular Biology and Evolution* (8), 854-860.
- Elphick, J. (Ed.) (2008): *Cesty stěhovavých ptáků - Atlas migrace ptáků celého světa*. Nakladatelství Slovart, Praha.
- Faircloth, B.C., Ramos, A., Drummond, H. & Gowaty, P.A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *Conservation Genetics Resources* (1), 159-162.
- Feldheim, K.A., McFarlane, M.L. & Bowie, R.C.K. (2006): Isolation of highly polymorphic autosomal microsatellite loci and a sex-linked locus from sugarbirds. *Molecular Ecology Notes* (6), 1019-1021.
- Fike, J.A., Devault, T.L. & Rhodes, O.E. (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* (9), 1183-1185.
- FitzSimmons, N.N., Moritz, C. & Moore, S.S. (1995): Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of Marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* (3), 432-440.
- Fridolfson, A.-K. & Ellegren, H. (1999): A simple universal method for molecular sexing of non-ratite bird. *Journal of Avian Biology* (30), 116-121.
- Garza, J.C. & Williamson, E.G. (2001): Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* (10), 305-318.
- 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.
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L. & Feldman, M.W. (1995): An evolution of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* (139), 463-471.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. & Dawson, J.G. (1998): A DNA tests to sex most birds. *Molecular Ecology* (7), 1071-1075.
- 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, Ch.J.,

- Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D. W., Witt, Ch.C., Yuri, T. (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* (320), 1763-1768.
- Hadfield, J.D., Richardson, D.S. & Burke, T. (2006): Towards unbiased parentage assignment: combining genetic, behavioral and spatial data in a Bayesian framework. *Molecular Ecology* (15), 3715-3730.
- 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.
- Herlin, M., Taggart, J.B., McAndrew, B.J. & Penman, D.J. (2007): Parentage allocation in a complex situation: A large commercial Atlantic cod (*Gadus morhua*) mass spawning tank. *Aquaculture* (272), 195-203.
- Hickman, C.R., Peters, M.B., Crawford, N.G., Hagen, C., Glenn, T.C. & Somers, Ch.M. (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* (8), 1439-1441.
- Hill, A. & Green, M.C. (2011): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* (3), 13-15.
- del Hoyo, J., Elliott, A. & Sargatal, J. (1992): Handbook of the Birds of the World, Vol. 1, Lynx Edicions, Ostrich to Ducks. Barcelona.
- Huang, X., Zhou, X. & Chen, M. (2010) Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics* (11), 1211-1214.
- Hudec, K. & kol. (1994): Fauna ČR a SR, Svazek 27, Ptáci – Aves díl 1., druhé přepracované a doplňkové vydání, Akademie věd České republiky, Praha.
- Humeau, L., da Silva, D., Guérin, F., Jaquement, S., Requier, J.-B., le Corne, M. (2010): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Pheathon lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- 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. (2005): GERUD 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes* (5), 708-711.
- Jones, A.G. & Ardren, W.R. (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* (12), 2511-2523.
- Jones, A.G., Small, C.M., Paczolt, K.A. & Ratterman, N.L. (2010): A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* (10), 6-30.
- 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.
- Kempenaers, B., Verheyen, G.R., van den Broeck, M., Burke, T., van Broeckhoven, Ch. & Dhondt, A.A. (1992): Extra-pair paternity results from female preference for high-quality males in the blue tit. *Nature* (357), 494-496.
- McKilligan, N. (2005): Herons, Egrets and Bitterns: Their biology and conservation in Australia, CSIRO Publishing, Australia.
- Maak, S., Wimmers, K. & Weigend, 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.
- Mayer, C., Schiegg, K. & Pasinelli, G. (2008): Isolation, characterization and multiplex genotyping of 11 autosomal and four sex-linked microsatellite loci in the reed bunting, *Emberiza schoeniclus* (Emberizidae, Aves). *Molecular Ecology Resources* (8), 332-334.
- Mercer, D.M., Haig, S.M. & Mullins, T.D. (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources*, in press.
- 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.
- Navrátilová, J. (2009): Polymorfni DNA mikrosatelity u čápa černého (*Ciconia nigra*). - Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

- 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., Pádu, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R. & Vieira, M.L.C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* (29), 294-307.
- Opatrný, E. (2003): *Fylogeneze a systém strunatců (Repetitorium)*. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc.
- Painter, I. (1997): Sibship reconstruction without parental information. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics* (2), 212-229.
- Reid, J.M., Arcese, P., Sardell, R.J. & Keller L. (2011): Heritability of female extra-pair paternity rate in song sparrows (*Melospiza melodia*). *Proceedings of the Royal Society of London, Series B - Biological Science* (278), 1114-1120.
- Reichholf, J.H. & Steinbach, G. (2003): *Zoologická encyklopedie Ptáci*. Knižní klub, Praha.
- Roeder, A.D., Marshall, R.K., Mitchelson, A.J., Visagathilagar, T., 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.
- Rousset, F. (2008): GENEPOP' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* (8), 103-106.
- Santos, M.S., Gonçalves, C., Barbosa, M.S.R., Silva, A. & Schneider, 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, M.S. & 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.
- 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.
- Sheldon, F.H. & Slikas, B. (1997): Advances in Ciconiiform Systematics 1976-1996. *Colonial Waterbirds* (20), 106-114.

- Shephard, J.M., Galbusera, P., Helemans, 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.
- Svensson, L. & Grant, P.J. (2004): Praktická určovací příručka (Ptáci Evropy, severní Afriky a Blízkého východu), Svojtka & Co., Praha.
- Šťastný, K., Bejček, V. & Hudec, K. (2006): Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice, Avetinum s. r. o., Praha.
- Šťovíček, O., Čížková, D., Liu, Y., Albrecht, T., Heckel, G., Vyskočilová, M. & Kresinger, J. (2011): Development of microsatellite markers for a diving duck, the common pochard (*Aythya ferina*). *Conservation Genetics Resources*, in press.
- Taylor, S.A., Morris-Pocock, J.A., Sun, Z. & Friesen, V.L. (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* (151), 525-528.
- Tomasulo-Seccomandii, 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.
- Vlachos, Ch.G., Bakaloudis, D.E., Alexandrou, O.G., Bontzorlos, V.A. & Papakosta, M.A. (2008): Factors affecting the nest site selection of the black stork, *Ciconia nigra* in the Dadia-Lefkimi-Soufli National Park, north-eastern Greece, *Folia Zoologica* (3), 251-257.
- Wilson, R (2008): Sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) – Modern samples. Summer studentship 2007/2008. Published online (awcmee.massey.ac.nz).
- Wood, D.S. (1984): Concordance between classifications of the Ciconiidae based on behavioral and morphological data. *Journal of Ornithology* (125), 25-37.
- 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.

10 Příloha

