

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



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

**Diplomová práce**

**Bc. Eva Burianová**

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 28.7.2011

.....

Ráda bych tímto upřímně poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Petru Nádvořníkovi, Ph.D. za svěřeni zajímavého tématu, za jeho čas, trpělivost a neocenitelné rady, které mi poskytnul při psaní této diplomové práce. Můj dík patří také mému drahému manželovi za trpělivou technickou asistenci při psaní této práce.

## SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá vyhledáváním nových polymorfních mikrosatelitových markerů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*) metodou *cross-species* PCR amplifikace a jejich charakterizací.

Teoretická část práce byla zaměřena na podrobnější popis studovaného druhu, jeho taxonomické zařazení a dosud objevené mikrosatelitové markery. Dále se věnuje obecné charakteristice mikrosatelitů a jejich využití při determinaci paternity.

V experimentální části bylo analýzou 198 *cross-species* párů primerů nalezeno celkem 13 polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa bílého. Retestováním několika mikrosatelitových lokusů vyhodnocených v bakalářské práci (Obručová, 2009) u čápa bílého jako monomorfní byl nalezen další polymorfní mikrosatelit. Primery amplifikující tyto polymorfní mikrosatelitové lokusy byly primárně odvozeny z DNA zástupců čtyř různých řádů: brodiví (Ciconiiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes) a veslonoží (Pelecaniformes). V další fázi byly tyto polymorfní lokusy genotypovány společně s polymorfními lokusy získanými v bakalářské práci (Obručová, 2009). Pomocí statistického programu Cervus 3.0.3 byly analýzou genotypů získány jejich detailní charakteristiky. Ty pomáhají určit vhodnost a spolehlivost mikrosatelitových lokusů jako genetických markerů pro budoucí možné analýzy (například determinace paternity či variability populace).

Pomocí programu Genepop 4.0.10 byla zjištěna silná fyzická vazba mezi třemi mikrosatelitovými lokusy. Čtyři lokusy byly vázány na pohlaví (3 mikrosatelity byly vázány na Z chromozom, u dalšího mikrosatelitu je způsob vazby na pohlaví nejasný). Nakonec byl testován polymorfismus mikrosatelitových lokusů již dříve popsanych přímo u čápa bílého.

## SUMMARY

The main aim of this master thesis was to obtain new polymorphic microsatellite markers for white stork (*Ciconia ciconia*) using cross-species PCR amplification and to characterize them.

The theoretical part of this thesis firstly deals with a detailed description of the white stork, its taxonomy and so far discovered microsatellite markers. Further was this theoretical part focused on general characteristics of microsatellite loci and their using for determination of paternity.

In the experimental part of this thesis it was discovered 13 polymorphic microsatellite loci for white stork by analysing 198 cross-species primer pairs. Another polymorphic microsatellite was discovered by re-testing several microsatellite loci which were previously described as monomorphic for white stork (Obručová, 2009). All primers providing polymorphic products were primary derived from DNA of species from four different orders: Ciconiiformes, Charadriiformes, Phoenicopteriformes and Pelecaniformes. Further the polymorphic microsatellite loci obtained in this thesis were genotyped together with polymorphic loci obtained in the bachelor thesis (Obručová, 2009). By analysing genotypes were obtained details characteristics using a statistical program Cervus 3.0.3. These characteristics help to determine suitability and reliability of microsatellite markers for future possible analyses (as determination of paternity or population variability).

The strong physical linkage was found out among three microsatellites using a statistical program Genepop 4.0.10. Four microsatellite loci were sex-linked (3 microsatellites were Z-linked, sex-linkage of the fourth microsatellite was unclear). Finally was analysed polymorphism of microsatellite loci described directly for white stork.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>9</b>
3.1	Charakteristika čápa bílého ( <i>Ciconia ciconia</i> ).....	9
3.1.1	Výskyt.....	9
3.1.2	Hnízdění.....	10
3.1.3	Taxonomické zařazení .....	11
3.1.4	Populace čápa bílého .....	13
3.1.5	Mikrosatelitové lokusy u čápa bílého .....	14
3.2	Mikrosatelitové markery .....	15
3.2.1	Základní charakteristika mikrosatelitů.....	16
3.2.2	Genetické vlastnosti mikrosatelitů.....	17
3.2.2.1	Mutační mechanismy.....	17
3.2.2.2	Mutační modely.....	19
3.2.3	Výskyt mikrosatelitů v genomu a jejich funkce .....	20
3.2.4	Metody hledání mikrosatelitů .....	21
3.3	Analýza paternity pomocí mikrosatelitů .....	21
3.3.1	Komplikace při hodnocení.....	22
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>24</b>
4.1	Biologický materiál.....	24
4.2	PCR amplifikace DNA.....	24
4.3	Zpracování PCR produktů.....	27
4.4	Statistické zpracování výsledků .....	28
4.5	Chemikálie .....	29
4.6	Použité roztoky.....	29
4.7	Laboratorní pomůcky a přístroje.....	31
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>62</b>

# 1 ÚVOD

Mikrosatelity jsou krátké repetitivní sekvence DNA přítomné v genomu všech eukaryotních organismů. Staly se velmi oblíbeným genetickým nástrojem pro určování příbuzenských vztahů mezi jedinci v populaci, zejména pak pro určování paternity. Analýza je založena na PCR amplifikaci mikrosatelitové DNA a vizualizaci vzniklých PCR produktů pomocí elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu. Následně se porovnávají genotypy potenciálních rodičů a potomků.

Přibývá stále více druhů, u kterých byly mikrosatelitové lokusy charakterizovány. Avšak u čápa bílého dosud existuje pouze jedna nedávno publikovaná studie (Shepard *et al.*, 2009), která se zabývá charakterizací mikrosatelitových lokusů. Problematice mikrosatelitových lokusů u čápa bílého jsem se věnovala již ve své bakalářské práci (Obručová, 2009), kde jsem testováním 167 párů primerů odvozených z DNA ptáků z různých řádů a jednoho párů primeru odvozených od savců našla 20 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Tato diplomová práce na předchozí bakalářskou práci navazuje a počet polymorfních lokusů u čápa bílého rozšiřuje a detailně charakterizuje. *Cross-species* PCR amplifikací byly otestovány další od té doby publikované mikrosatelity popsané především u zástupců z řádu brodivých (Ciconiiformes), plameňáků (Phoenicopteriformes) a veslonohých (Pelecaniformes).

## 2 CÍLE PRÁCE

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



## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

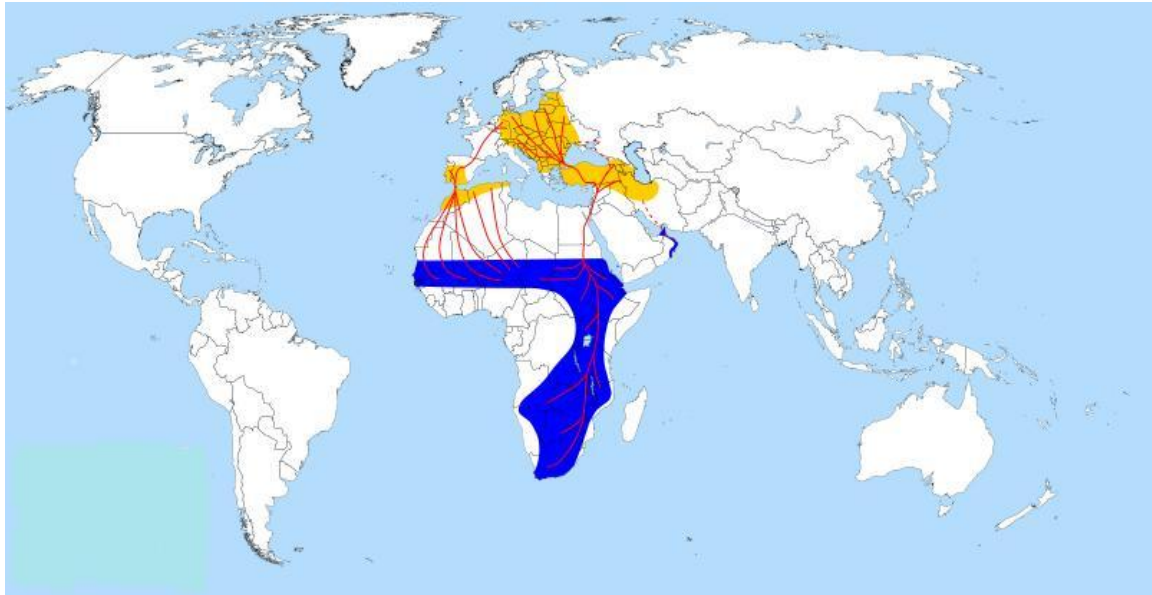
### 3.1 Charakteristika čápa bílého (*Ciconia ciconia*)

Díky svým rozměrům (průměrná hmotnost 3,5 kg, výška 1 m, maximální rozpětí křídel až 2 m) patří čáp bílý k největším zástupcům řádu brodiví na našem území. Tento nápadný pták je zbarven do bíla, jen letky a velké křídelní krovky jsou černé (Hudec *et al.*, 1994). Jeho dlouhý zobák a nohy jsou červené. Pohlavní dimorfismus není patrný, samice bývají pouze v průměru menší. Mláďata jsou zbarvena nenápadněji, mají načernalý zobák a tmavě zbarveny nohy a duhovku. Čápi se běžně dožívají 8 až 10 let. Jejich hlasové ústrojí je zakrnělé, komunikují mezi sebou proto pouze typickým klapáním zobáku nebo syčením (del Hoyo *et al.*, 1992). Čáp bílý je převážně masožravý pták, živí se drobnými obratlovci, plazy, obojživelníky a některými druhy hmyzu (Brown *et al.*, 1982). V celosvětovém měřítku není ohrožených druhem, podle Červeného seznamu ohrožených druhů IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) verze 2011.1 je zařazen v kategorii *least concern* (málo dotčené druhy) (Anonymous, 2011). V České republice byl zařazen do kategorie téměř ohrožený druh (Plesník *et al.*, 2003).

#### 3.1.1 Výskyt

Čáp bílý je typický tažný pták. Areál výskytu se proto rozlišuje na zimoviště a hnízdiště. Hnízdí ve střední a jižní Evropě včetně Pyrenejského poloostrova, vyskytuje se také v severozápadní Africe a západní Asii. Koncem července až začátkem září se začíná vydávat do zimovišť, která se nacházejí na africkém kontinentě jižně od Sahary. Zřídka zimuje kolem Středozemního moře (Hudec *et al.*, 1994). Během února začíná odlétat zpět do hnízdišť v hejnech. Není pro něj typické utváření pravidelných formací v průběhu tahu (del Hoyo *et al.*, 1992). Do zimovišť čápi migrují dvěma hlavními směry. Jelikož jsou závislí na teplých vzdušných proudech vznikajících nad pevninou, snaží se obletět Středozemní moře. Západní cesta vede skrz Španělsko přes Gibraltar a východní přes Bospor a Suezský průplav (Brown *et al.*, 1982) (viz obrázek č. 1).

V České republice je čáp bílý rozšířen na většině území. Hnízdí zejména v oblastech nížin a středních poloh jako jsou například rybníčnaté oblasti jižních Čech, Ostravsko či jižní Morava (Hudec *et al.*, 1994, Šťastný *et al.*, 2006).



**Obrázek č. 1:** Zeměpisné rozšíření čápa bílého. Modře jsou vyznačena zimoviště, oranžově hnízdiště, červeně jsou označeny migrační tahy (převzato a upraveno dle wikipedia.org).

### 3.1.2 Hnízdění

Čáp bílý hnízdí jednou ročně. Jedinci pohlavně dospívají ve věku 2 let a hnízdí mezi 2. – 7. rokem života (Brown *et al.*, 1982). Ve dvoudenním intervalu samice obvykle snáší 2 – 4 bílá vejce, z nichž se po 33 – 34 dnech vylíhnou mláďata. Péče o ně i o vejce je rozdělena mezi oba rodiče. Mláďata jsou po tři měsíce zcela závislá na rodičích, kteří jim do hnízda přinášejí potravu. Od 22. dne jsou schopna se postavit, okolo 60. dne začínají létat (del Hoyo *et al.*, 1992) (obrázek č. 2). Čápi si svá hnízda typicky staví na vyvýšených místech například na stromech, věžích, opuštěných komínech, elektrických rozvodných zařízeních, sloupech a podobně. Hnízda mohou po každoroční úpravě využívat několik let po sobě.



**Obrázek č. 2:** Čáp bílý s mládřaty na svém hnízdě.

### 3.1.3 Taxonomické zařazení

Čáp bílý je zástupcem ptáků řádu brodivých (Ciconiiformes). Systematika a fylogenetické vztahy v rámci tohoto řádu se zdají být se zvyšujícím se počtem molekulárních analýz značně komplikovanější a doposud nejsou zcela vyřešeny. S největší pravděpodobností tento řád není monofyletický (Sheldon *et* Slikas, 1997).

Tradiční klasifikační systém, založený na pečlivém zkoumání morfologických znaků, rozděluje tento řád na 5 čeledí, jsou to volavkovití (Ardeidae), člunozobcovití (Balaenicipitidae), kladivoušovití (Scopidae), čápoovití (Ciconiidae) a ibisovití (Threskiornithidae).

Další nová klasifikace vznikla na základě molekulárně-biochemických metod. Za použití DNA-DNA hybridizačních technik se systematicky zkoumala podobnost genomů jednotlivých druhů ptáků. Vznikl klasifikační systém, který je založen téměř výhradně na genetické příbuznosti odvozené z dat získaných touto technikou (Proctor *et* Lynch, 1993). Od původního morfologického systému se v mnohém odlišuje a k překvapivým změnám došlo i v případě řádu brodivých. Do této klasifikace byly rovněž zařazeny nové taxonomické kategorie, jako infratřída (*infraclass*), parvotřída (*parvclass*), nadřád (*superorder*), podřád (*suborder*) či infrařád (*infraorder*). Stávající taxonomické kategorie (třída, řád, či čeleď) nebyly dostačující pro zobrazení aktuálně zjištěných příbuzenských vztahů mezi hlavními skupinami ptáků. Podle tohoto nového klasifikačního systému je řád brodivých zařazen do nadřádu Passerimorphae a dělí se na dva další podřády Charadrii a Ciconii. Řád se značně rozšířil o mnoho stávajících řádů, které se tímto zrušily. Byly sem nově přiřazeny řády: bahňáci (Charadriiformes), dravci

(Falconiformes), veslonoží (Pelecaniformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), potáplice (Gaviiformes), trubkonosí (Procellariiformes) a tučňáci (Sphenisciformes) (Proctor *et* Lynch, 1993).

Příbuznost zástupců řádu brodivých s dravci a plameňáky se přepokládala již dříve na základě anatomických znaků. Podle nich by mohly být příbuzní i s řádem veslonohých (Pelecaniformes) (Hudec *et al.*, 1994).

Fylogenomická rekonstrukce je řešena i v práci výzkumného týmu Hackett *et al.* (2008). Čeledi řádu brodivých jsou zde promíchány v rámci jednoho fylogenetického kladu s čeledmi řádu veslonohých a studie rovněž neprokázala žádnou spojitost mezi čápy a dravci jako v případě výše zmíněné molekulárně-biochemické klasifikace.

Dále je uvedeno zařazení čápa bílého do systému podle tradiční klasifikace (vlevo; Opatrný, 2003) a příklad alternativního systémového zařazení (vpravo, Sibley *et* Ahlquist dle Proctor *et* Lynch, 1993):

Říše:	Animalia (živočichové)
Oddělení:	Bilateria
Pododdělení:	Deuterostomia (druhoustí)
Kmen:	Chordata (strunatci)
Podkmen:	Vertebrata (obratlovci)
Třída:	Aves (ptáci)



Nadřád:	Neognathae (létaví)
<b>Řád:</b>	<b>Ciconiiformes (brodiví)</b>
Čeď:	Ciconiidae (čápvití)
Rod:	<i>Ciconia</i> (čáp)
Druh:	<i>Ciconia ciconia</i> (čáp bílý)

Infratřída:	Neoaves
Parvotřída:	Passerae
Nadřád:	Passerimorphae
<b>Řád:</b>	<b>Ciconiiformes</b>
Podřád:	Ciconii
Infrařád:	Ciconiides
Čeď:	Ciconiidae
Rod:	<i>Ciconia</i>
Druh:	<i>Ciconia ciconia</i>

U čápa bílého existují dva podruhy, a to *Ciconia ciconia ciconia* (čáp bílý evropský, Linnaeus 1978) a *Ciconia ciconia asiatica* (čáp bílý středoasijský, Severtsov, 1873) (del Hoyo *et al.*, 1992).

### 3.1.4 Populace čápa bílého

Stavy čápa bílého prodělaly od začátku druhé poloviny 20. století v celé Evropě s výjimkou několika zemí citelný úbytek (Rejman *et Lacina*, 2002). Na několika územích došlo i k celkovému lokálnímu vyhynutí, například v Belgii, Švédsku či Švýcarsku (Šťastný *et al.*, 2006). Proto bylo také zahájeno mnoho záchranných projektů a v poslední době se celoevropská populace opět pozvolna zvětšuje a počet hnízdících párů se zvyšuje, v roce 2004 dosáhl počet párů více než 180 000 (Rejman *et Lacina*, 2002). Například ve Švédsku se opětovně navrácení čápa bílého do přírody úspěšně uskutečňuje od roku 1989 (Olsson, 2007).

Populační úbytek bývá způsobován zejména dvěma hlavními faktory, a to destrukcí přirozeného prostředí a změnami ve způsobu zemědělského obhospodařování (del Hoyo *et al.*, 1992). Zásahem člověka do krajiny a zintenzivněním zemědělské činnosti se ztrácejí přirozené lokality, rozhodujícím činitelem je zejména rozsah mokřích luk a pastvin.

Reprodukční úspěšnost je také negativně ovlivňována nízkými teplotami a četností srážek, zejména v období několika dní čerstvě po vylíhnutí, kdy je termoregulace mláďat nedokonalá. Proto oblasti s chladnými a deštivými jarními měsíci přispívají k nižší populační hustotě než oblasti s teplejším jarním obdobím. (Carrascal *et al.*, 1993). Hojnost populací je tedy kromě přímého lidského vlivu (jako je lov, pesticidy, ničení hnízd, elektrické vedení) významně ovlivněna charakterem prostředí a klimatu, který tu panuje.

### Monitoring hnízdních populací v České republice

Populace čápa bílého je v celém areálu hnízdního rozšíření monitorována od roku 1934, kdy proběhlo první sčítání na území České republiky (Rejman *et Lacina*, 2000). Pravidelné každoroční sčítání hnízdních párů čápa bílého je na našem území prováděno od roku 1984. Tento každoroční monitoring organizuje Skupina pro výzkum, ochranu a evidenci čápa bílého v České republice pod záštitou České společnosti ornitologické. Údaje jsou uchovávány v centrální kartotéce a postupně převáděny do počítačové databáze, která usnadňuje jejich zpracování. Tato databáze je navíc doplňována

fotodokumentací pro snadnou identifikaci hnízd. Mezi zaznamenanými údaji nalezneme například geografické informace (kraj, obec, okres, nadmořská výška), údaje o umístění, výšce nad zemí, případně zjištěné zajímavosti z pozorování (Rejman *et* Lacina, 2002).

Na rozdíl od většiny evropských zemí na území České republiky nebyl zaznamenán v minulém století pokles stavu populace (Rejman *et* Lacina, 2002). Poslední oficiálně zveřejněné informace o hnízdním rozšíření čápa bílého v České republice jsou z roku 2003. Bylo zaznamenáno 1221 hnízd, 811 párů a mláďata byla vyvedena z 603 hnízd (Šťastný *et al.*, 2006).

### 3.1.5 Mikrosatelitové lokusy u čápa bílého

Doposud byl publikován pouze jediný článek popisující polymorfní mikrosatelitové lokusy u čápa bílého. V něm bylo charakterizováno sedm nových mikrosatelitových lokusů a šest odvozených od zástupce ze stejné čeledi (Ciconiidae) nesyta amerického (*Mycteria americana*) (Shepard *et al.*, 2009). Paralelně s jejich prací bylo pomocí PCR amplifikace s použitím *cross-species* primerů u čápa bílého nalezeno a popsáno 20 polymorfních lokusů v bakalářské práci (Obručová, 2009). V této své bakalářské práci jsem prováděla analýzu se 168 páry primerů amplifikujícími polymorfní mikrosatelitové lokusy, které byly odvozeny z DNA zástupců ze 7 různých řádů: brodiví, potápky, veslonozí, vrubozobí, plameňáci, tučňáci a sudokopytníci. Testování probíhalo na DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého. Nalezených 20 polymorfních lokusů bylo amplifikováno pomocí primerů pocházejících od zástupců z řádu brodivých (nesyt americký, ibis rudý, ibis japonský, kolpík růžový, kvakoš noční, volavka velká), z řádu veslonožích (kormorán galapážský, pelikán bílý, pelikán severoamerický) a z řádu plameňáci (plameňák karibský) (přehled viz tabulka č. 1). U dvou párů mikrosatelitových lokusů bylo zjištěno, že se jedná o tzv. ortologní mikrosatelity (Navrátilová, 2009, Obručová, 2009). V tomto případě je jeden lokus prezentován jako dva nezávislé lokusy. Podobné případy nejsou ojedinělé (Dawson *et al.*, 2006), a je proto potřeba lokusy testovat, zda mezi nimi není vazebné spojení.

S přihlédnutím na úspěšnost *cross-species* amplifikace mezi jednotlivými taxony, jak blízce tak i vzdáleně příbuznými, jsem v této diplomové práci pokračovala v testování nově objevených mikrosatelitů, které byly od té doby aktuálně publikovány u dalších zástupců ze stejných řádů:

- brodiví (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), veslonozí (Pelecaniformes)

Dále jsem rovněž přidala analýzu několika mikrosatelitových lokusů popsanych u zástupců z dosud netestovaných řádů:

- potáplice (Gaviiiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes)

Aktuálně bylo také objeveno vědeckým týmem německé univerzity ve Freiburgu pod vedením prof. Segelbachera 6 nových mikrosatelitových lokusů u čápa bílého. Doposud nejsou publikovány, na základě osobního sdělení byly získány sekvence primerů.

**Tabulka č. 1:** Polymorfni mikrosatelitové lokusy u čápa bílého (*Ciconia ciconia*) nalezených metodou *cross-species* PCR amplifikace (Obručová, 2009).

Řád	Zdrojový druh	Počet lokusů	Počty alel
<b>Brodiví</b>	Nesyt americký ( <i>Mycteria americana</i> )	8	2-4
	Kvakoš noční ( <i>Nycticorax nycticorax</i> )	1	2
	Volavka velká ( <i>Ardea herodias</i> )	1	2
	Ibis rudý ( <i>Eudocimus ruber</i> )	3	2
	Ibis japonský ( <i>Nipponia nippon</i> )	1	2
	Kolpík růžový ( <i>Ajaia ajaja</i> )	1	2
<b>Veslonoží</b>	Kormorán galapážský ( <i>Phalacrocorax harrisi</i> )	1	4
	Pelikán bílý ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	2	2-5
	Pelikán severoamerický ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	1	5
<b>Plameňáci</b>	Plameňák růžový ( <i>Phoenicopterus ruber</i> )	1	2

### 3.2 Mikrosatelitové markery

Genetické markery jsou obecně dědičné znaky, určité jednotky informace, kterými může být detekována genetická variabilita mezi jedinci. Důležitou podmínkou je, aby byl marker polymorfni, tzn. aby existoval v několika různých variantách. Genetickým markerem může být fenotypový znak, protein či sekvence DNA.

Tradičně může být diverzita uvnitř a mezi populacemi determinována hodnocením morfologických znaků (markery morfologické). Sledují se různé fenotypové projevy alel genů (například odlišná výška či barva očí).

Další skupinou markerů jsou markery proteinové (biochemické), kam patří zejména izoenzymy. Jedná se o různé varianty téhož enzymu, které katalyzují stejnou biochemickou reakci, ale liší se v primární struktuře. Na základě této odlišnosti v aminokyselinové sekvenci se dají rozlišit podle různé elektroforetické pohyblivosti (rozdíly se odráží v celkovém náboji, velikosti a tvaru molekuly) (Kahl *et* Meksem, 2005).

Poslední skupinou, která je v dnešní době nejpočetnější a nejvíce využívaná, jsou DNA markery vycházející z polymorfismu nukleotidových sekvencí. DNA polymorfismus se detekuje technikami založenými na hybridizaci (například RFLP), sekvenování (SNP) nebo metodou PCR (například RAPD, AFLP či markery odvozené z repetitivních sekvencí). Právě do této skupiny patří mikrosatelitové markery, které byly použity v praktické části této práce.

### 3.2.1 Základní charakteristika mikrosatelitů

Mikrosatelity (též označovány SSRs – *simple sequence repeats* či STRs – *short tandem repeats*) patří mezi repetitivní sekvence DNA. Tento termín souhrnně označuje homologní DNA úseky, které jsou v genomu přítomny v několikanásobných kopiích (Jurka *et al.*, 2007). Existují dva základní typy repetitivní sekvence, a to rozptýlené repetice a tandemové repetice. Prvním typem jsou repetice, které jsou rozmístěny více či méně náhodně na různých místech genomu. Na rozdíl od nich, druhý typ - tandemové repetice přiléhají bezprostředně jedna za druhou v určitém úseku genomu. Do této skupiny jsou zařazeny mikrosatelity, v nichž jsou repetice vytvářeny krátkými motivy seřazenými tandemově za sebou (Flegr, 2005). Délka těchto motivů je obvykle mezi 2-6 bp (Tóth *et al.*, 2000).

Mikrosatelity vykazují vysoký stupeň polymorfismu (Weber *et* May, 1989), a proto se staly velmi užitečnými a velice často používanými genetickými markery (Jarne *et* Lagoda, 1996). K popularitě navíc přispěla snadnost a finanční dostupnost analýzy. K zjištění polymorfismu není zapotřebí žádné speciální a nákladné vybavení, detekce je založena na technice PCR a následné gelové elektroforéze.

Podle typu repetice se mikrosatelity nejčastěji dělí na di -, tri- či tetranukleotidové sekvence. Dále se také rozdělují podle vzájemného uspořádání repetice na:

- Dokonalé (perfect): jsou složeny z jediné základní repetice, která není přerušena žádnou bází (například TATATATATATA)



- Nedokonalé (imperfect): základní repetice je přerušena jiným párem bází (například TATATACTATATA)
- Přerušované (interrupted): mezi základní repetici je vložena malá sekvence, která s ní nijak nesouvisí (například TATATACGTGTTATATA)
- Složené (composed): se skládají ze dvou těsně přiléhajících odlišných repetic (například TATATATATAGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

### 3.2.2 Genetické vlastnosti mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou děděny podle pravidel Mendelovské genetiky (Sharma *et al.*, 2007). Patří mezi kodominantní genetické markery, je tedy možné od sebe odlišit heterozygota a homozygota. Homozygotní mikrosatelitový lokus má stejný počet repetic na obou homologních chromozomech, zatímco heterozygotní mikrosatelitový lokus má odlišný počet repetic pro každou alelu, například jedna alela je složena z 9 repetic a druhá z 10. Alelou je tedy v případě mikrosatelitů míněna délková variabilita. V rámci populace jako celku může existovat pro stejný mikrosatelitový lokus několik různých variant alel, což umožňuje od sebe odlišit dva různé jedince (Oliveira *et al.*, 2006).

#### 3.2.2.1 Mutační mechanismy

Vysoký polymorfismus mikrosatelitů je způsoben variabilním počtem kopií jednotlivých repetic (Ellegren, 1992). Počet opakování základního motivu v jednotlivých lokusech se tedy liší, v případě mikrosatelitů dosahuje celková délka lokusu až 150 nukleotidů (Flegr, 2005). Variabilita v počtu repetic v rámci lokusu souvisí s jejich vysokou proměnlivostí. Mutabilita v případě mikrosatelitů je mnohem vyšší než u ostatních sekvencí v genomu, pohybuje se okolo 0,1 % za generaci. Jde o jednu z nejrychleji vyvíjejících se sekvencí DNA (Weber *et Wong*, 1993, Flegr, 2005).

Stupeň alelové rozličnosti také pozitivně koreluje s délkou repetice. Lokusy s delšími repeticemi jsou obecně polymorfnější než lokusy s kratšími motivy (Valdes *et al.*, 1993, Scribner *et Pierce* 2000). Mikrosatelitová nestabilita může být ovlivněna i uspořádáním repetice. Přerušovaný typ mikrosatelitu zpravidla méně podléhá mutacím než dokonalý typ. Je to zřejmě díky tomu, že sekvence vložená mezi jednotky mikrosatelitu znesnadňuje sklouznutí DNA polymerázy (Kunst *et al.*, 1997). Bylo také zjištěno, že mutační procesy ovlivňuje i pohlaví jedince. Například mikrosatelitové

lokusy u samců vlaštovek obecných (*Hirundo rustica*) podléhaly téměř dvakrát více mutacím než lokusy u samic (Primmer *et al.*, 1997).

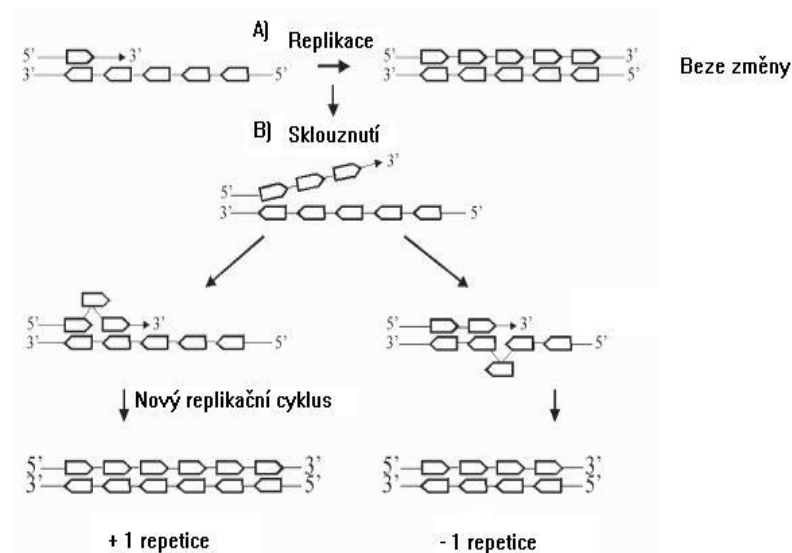
Existují dva základní mechanismy, kterými se vysvětluje vysoká mutační rychlost mikrosatelitů, a to je sklouznutí DNA polymerázy a nerovnoměrná rekombinace (Wierdl *et al.*, 1996).

### **Nerovnoměrná rekombinace**

Rekombinace může změnit délku mikrosatelitového lokusu nerovnoměrným crossing-overem nebo genovou konverzí (Harding *et al.*, 1992). K nerovnoměrnému crossing-overu (*unequal crossig-over*) dochází mezi dvěma homologními chromozomy během meiózy, kdy nedojde k výměně stejně dlouhých segmentů (Kočárek, 2008). Většinou dochází k drastickým změnám, tzn. ke ztrátě či získání značného počtu repetice. Během genové konverze dojde ke změně počtu repetice pouze na jednom vlákně, druhé zůstane nezměněno.

### **Sklouznutí (*slippage*) DNA polymerázy**

Ke sklouznutí DNA polymerázy může docházet v průběhu replikace či při opravě DNA (Oliveira *et al.*, 2006). Nově syntetizované vlákno DNA se dočasně oddělí od templátového, ale poté se znovu naváže díky repetitivní sekvenci na jinou pozici, s posunem o několik jednotek repetice. Pokud replikace pokračuje dál, změní se počet repetice, a tedy délka jejich alel. Při špatné reasociaci vláken je tedy část vykloněna mimo dvoušroubovici a vznikne klička buď na nově vznikajícím řetězci, což vede k následnému prodloužení repetice (expanzi) nebo se vytvoří klička na templátovém řetězci a repetice se zkrátí (delece) – viz obrázek č. 3 (Hancock, 1999). Tento mechanismus je považovaný za hlavní zdroj mutability mikrosatelitů (Levinson *et Gutman*, 1987).



**Obrázek č. 3:** Sklouznutí DNA polymerázy během replikace. A - pokud proběhne standardní replikace, počet repetice (5 – znázorněno rámečky) zůstane nezměněn. B - v případě sklouznutí DNA polymerázy a následném doreplikování řetězce dojde ke změně počtu repetice (na 4 a 6) (převzato a upraveno dle Oliveira *et al.*, 2006).

### 3.2.2.2 Mutační modely

Teoretické mutační modely slouží pro správný odhad populačních parametrů (jako je genetická struktura populací, jejich vzájemná evoluční vzdálenost, počet migrací za generaci a jiné) z experimentálních dat získaných z analýzy mikrosatelitů (Estoup *et Cornuet*, 1999). Také se používají k odvození předpokládaného počtu alel v populaci z pozorované heterozygotnosti (Oliveira *et al.*, 2006).

#### A) *Infinite allele model* (IAM, Kimura *et Crow*, 1964)

Tento model zahrnuje mutace mikrosatelitových alel, při kterých dojde ke ztrátě či získání různého počtu repetice. Vždy vzniká nová alela, která se v populaci předtím nevyskytovala. Pokud se tedy v populaci vyskytují dvě stejné alely, mají i stejný původ (Harding *et al.*, 1993).

#### B) *Stepwise mutation model* (SMM, Kimura *et Ohta*, 1978)

Na rozdíl od předchozího modelu, tento model předpokládá, že mutace jsou způsobeny delecí nebo inzercí vždy jen jediné repetice. Z toho vyplývá, že dvě alely lišící se pouze jednou repeticí, jsou příbuznější než alely, které se liší ve více

repeticích (Oliveira *et al.*, 2006). Mutací může vzniknout alela, která je již v populaci přítomna.

C) *Two phase model* (TPM, di Rienzo *et al.*, 1994)

Tento novější model rozšiřuje SMM model o předpoklad, že se mohou rovněž objevit (i když s malou frekvencí) rozsáhlejší mutace, při kterých dojde ke změně většího počtu repetit.

D) *K-allele model* (KAM, Crow *et* Kimura, 1970)

Předpokladem tohoto modelu je, že v populaci se vyskytuje přesně  $K$  možných alel a pravděpodobnost, s jakou alela mutuje na jinou, je rovna  $\mu/K - 1$  (kde  $\mu$  představuje mutační frekvenci) (Oliveira *et al.*, 2006).

### 3.2.3 Výskyt mikrosatelitů v genomu a jejich funkce

Mikrosatelitová DNA byla objevena v genomu u všech doposud zkoumaných eukaryotních organismů (Field *et* Willis, 1996). V genomu není pravidelně rozmístěna, obecně se vyskytuje více v nekódujících oblastech DNA (Li *et al.*, 2002). Mutace vznikající v kódujících oblastech zpravidla mění čtecí rámec, a proto jsou pod vysokým negativním selekčním tlakem (Metzgar *et al.*, 2000). Frekvence výskytu se také liší mezi jednotlivými taxony. Počet repetitivních sekvencí je tím nižší, čím má organismus menší velikost genomu a nižší obsah nekódující DNA (Hamada *et al.*, 1982). To platí i pro genom ptáků, který má oproti ostatním taxonům mezi obratlovci menší genom a tím pádem i znatelně nižší frekvenci výskytu mikrosatelitů (Primmer *et al.*, 1997).

Doposud není stále vyřešena otázka funkční role mikrosatelitů v genomu (Li *et al.*, 2004). Některé studie předpokládají, že mohou hrát roli v regulaci genů (Hamada *et al.*, 1984). Pokud byly odstraněny úseky repetitivní sekvence v oblasti promotoru, výrazně se snížila transkripční aktivita (Hoffman *et al.*, 1990). Mohou se také podílet na evoluci genomu, vývoji a adaptaci organismu (Li *et al.*, 2004) nebo mohou mít vliv na organizaci chromozomů a uspořádání genomu (Cuadrado *et* Schwarzacher, 1998). Zcela jistě se ale podílejí na vzniku některých závažných lidských chorob, jako je myotonická dystrofie, syndrom fragilního X nebo Huntingtonova choroba (Koreth *et al.*, 1996). Ve všech případech byla zaznamenána rozsáhlá expanze trinukleotidových repetitivních sekvencí.

### 3.2.4 Metody hledání mikrosatelitů

Existují dva základní způsoby, jak získat nové mikrosatelitové lokusy u druhu, u kterého ještě nebyly objeveny.

#### 1. Izolace mikrosatelitů *de novo*

Tímto klasickým způsobem se dají mikrosatelitové lokusy vyhledat přímo v genomu studovaného druhu. Je zapotřebí mít k dispozici genomovou knihovnu příslušného druhu. Jednotlivé klony této knihovny se následně skrínují hybridizací na nylonové membráně s vysokou hustotou. Značenou sondu tvoří oligonukleotidové repetice (Rashmann *et al.*, 1991). Pozitivní klony se následně osekvenují a vyhledají se ohraničující sekvence mikrosatelitu, podle kterých se navrhnou primery pro PCR analýzu (Zane *et al.*, 2002).

#### 2. *Cross-species* amplifikace

Touto metodou se mikrosatelitové lokusy amplifikují pomocí PCR za použití primerů, které jsou již známy u jiného blízkce příbuzného druhu (Ellegren, 1992). Mikrosatelitové primery nemohou být univerzálně využity mezi rozdílnými druhy díky nakumulovaným mutacím v oblastech *flanking regions*, ale u blízkých druhů je *cross-species* amplifikace relativně úspěšná (Primmer *et al.*, 2005). Šance na úspěšnou amplifikaci se tedy snižuje se zvyšující se fylogenetickou vzdáleností (Scribner *et Pearce*, 2000). Pomocí toho lze také sledovat evoluční vztahy a příbuznost mezi jednotlivými taxony. Tento přístup byl použit v této diplomové práci k hledání nových mikrosatelitových lokusů u čápa bílého.

### 3.3 Analýza paternity pomocí mikrosatelitů

Mikrosatelitové lokusy lze velmi efektivně využít pro stanovení paternity a příbuzenských vztahů jedinců v populaci. Tímto způsobem se také v ornitologii dají sledovat reprodukční strategie ptáků jako mimopárová paternita či vnitrodruhový hnízdění parazitismus (Ellegren, 1992). Molekulárně – genetické metody vnesly nový pohled na párovací strategie ptáků, které byly předtím předvídaný jednoduchým pozorováním charakteru sociálních vazeb (Griffith *et al.*, 2002). Odhalilo se, že sexuální

monogamie je daleko vzácnější, než jak se předpokládalo, a výskyt mimopárových mlád'at je častým jevem.

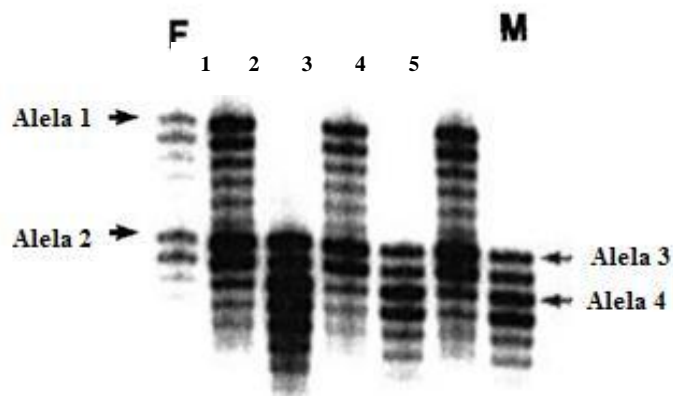
Určování paternity je založeno na porovnávání jednotlivých genotypů mezi potomky a potencionálními rodiči. Využívá se zde faktu, že mikrosatelity jsou striktně děděny podle Mendelovských pravidel. Potomek tedy může získat jen ty alely, které se vyskytují také u rodičů. Pokud získá vždy po jedné alele od každého rodiče, rodičovství je s vysokou pravděpodobností potvrzeno (Obrázek č. 4 a č. 5). Pro rodičovské analýzy se obvykle používá skupina 6 až 20 mikrosatelitových lokusů (Marshall *et al.*, 1998).

Jedinci čápa bílého, jsou považováni za monogamní druh (Zielinsky 2002, Reichard *et Boesch*, 2003). Mimopárová kopulace (EPC – *extra-pair copulation*) se objevuje zřídka, i v případě koloniálního hnízdění. Navíc byla pozorována zejména u jedinců, kteří čerstvě vytvořili pár (Tortosa *et Redondo*, 1992).

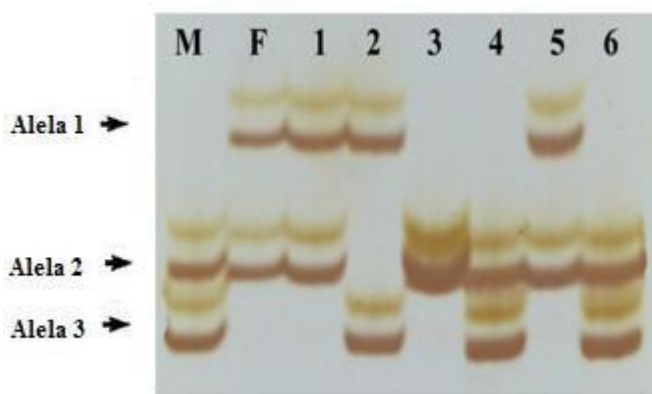
### 3.3.1 Komplikace při hodnocení

Problémy během hodnocení mohou způsobovat tzv. nulové alely a je potřeba s jejich výskytem počítat (Arden *et Jones*, 2003). Nulové alely se objevují, pokud se vyskytne mutace v místech, kam nasedají primery při PCR amplifikaci. Ty nemohou nasednout na homologní sekvenci (*flanking region*) a alela mikrosatelitu se neamplifikuje, přestože je přítomna. Heterozygot pak vypadá jako zdánlivý homozygot. Očekávanou frekvenci nulových alel dokáží snadno detekovat příslušné počítačové programy (například Cervus, Famoz či Parente) pomocí speciálního algoritmu jako odchylku od Hardy – Weinbergova zákona.

V některých případech může znesnadnit hodnocení také výskyt tzv. *stutter* bandů. Tyto bandy se objevují, pokud jsou produkty PCR mikrosatelitové amplifikace vizualizovány gelovou elektroforézou. Mikrosatelit má na výsledném gelu podobu bandu (proužku), resp. dvou proužků, protože se pracuje v denaturujících podmínkách a každý band znázorňuje jednotlivá vlákna dvoušroubovice DNA, která migrují mírně odlišně. *Stutter* bandy se vyskytují hned pod bandem mikrosatelitového lokusu (viz srovnání obrázku č. 4 a č. 5). Jsou pravděpodobně výsledkem sklouznutím DNA polymerázy během PCR amplifikace (Luty *et al.*, 1990)



**Obrázek č. 4:** Elektroforetogram PCR produktu mikrosatelitového lokusu PTC3 u lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*). Jedná se o příklad určení paternity pomocí PCR amplifikace. F je označení pro potenciální matku, M pro potenciálního otce, čísla 1 – 5 jsou označena jednotlivá mláďata, šipky na každé straně označují alely obou potenciálních rodičů. Všechna mláďata mají vždy po jedné alele od každého rodiče, žádné tedy není mimopárové. Na tomto příkladu jsou názorně vidět tzv. *stutter* bandy (Převzato a upraveno dle Ellegren, 1992).



**Obrázek č. 5:** Elektroforetogram PCR produktu mikrosatelitového lokusu Ase 48 u lindušky luční (*Anthus pratensis*). Jedná se o příklad určení paternity pomocí PCR amplifikace. F je označení pro potenciální matku, M pro potenciálního otce, čísla 1 – 6 jsou označena jednotlivá mláďata, šipky na každé straně označují alely obou potenciálních rodičů. Všechna mláďata mají vždy po jedné alele od každého rodiče, žádné rovněž není mimopárové (Převzato a upraveno dle Nádvorník, 2005).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Pro genetické analýzy byla použita DNA vyizolovaná z krve 23 mláďat čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Krev byla odebrána Mgr. Radkem Hamplem jednorázovou sterilní injekční jehlou a množství 20  $\mu$ l bylo ve zkumavce smícháno s 1 ml konzervačního roztoku Queen's pufru (Seutin *et al.*, 1991). Jednalo se o nepříbuzné jedince z různých hnízd z kraje Pardubického, Královéhradeckého a Vysočiny.

DNA byla vyizolována pomocí fenol – chloroformové metody a rozpuštěna v TE pufru. Pro testování *cross-species* primerů byla vybrána DNA 6 jedinců, genotypování polymorfních mikrosatelitových lokusů se uskutečnilo u všech 23 jedinců. Jejich pohlaví nebylo známé, proto bylo za pomoci mikrosatelitů vázaných na pohlaví (2550 F, 2718 R) zjištěno. Počet samic byl 12 a samců 11.

### 4.2 PCR amplifikace DNA

Reakce probíhaly v termocycleru (XP Thermal Cycler, BIOER technology) podle následujícího teplotního a časového profilu:

1. 94 °C: 5 min
  2. 94 °C: 30 s
  - 48 - 69 °C: 30 s
  - 72 °C: 30 s
  3. 72 °C: 7 min
- } 35 cyklů

Reakční směs byla umístěna v 1,5ml mikrozkuhavce obsahující komponenty uvedené v tabulce č. 2. Zkumavky byly po napipetování všech složek zvortexovány a centrifugovány. Každá reakce sestávala z 9  $\mu$ l PCR mixu a 1  $\mu$ l roztoku DNA (koncentrace byla upravena v rozmezí 10 - 50  $\mu$ g/ml). Tabulka č. 3 uvádí přehled testovaných mikrosatelitových lokusů.



**Tabulka č. 2:** Složení reakční směsi pro 6 a 23 vzorků (včetně počítaných ztrát při pipetování)

Složka reakční směsi	Koncentrace pracovního roztoku	Objem roztoku pro 6 vzorků [μl]	Objem roztoku pro 23 vzorků [μl]
Deionizovaná voda		42	182
Pufr	10 x	6,3	27,3
MgCl <sub>2</sub>	25 nmol/l	3,75	16,3
dNTPs	20 μmol/l	0,65	2,8
Primer F	10 μmol/l	3,1	13,4
Primer R	10 μmol/l	3,1	13,4
aTaq DNA polymeráza	2,5 U/μl	0,94	4,1

**Tabulka č. 3:** Přehled testovaných mikrosatelitových lokusů u čápa bílého. V jednotlivých sloupcích je uvedeno: řád, ze kterého zdrojový druh pochází; druh, u kterého byl mikrosatelitový lokus popsán, kdy a kým; název mikrosatelitového lokusu.

Řád	Zdrojový druh, literární zdroj	Mikrosatelitový lokus
Brodívi	Čáp bílý ( <i>Ciconia ciconia</i> ) Shephard <i>et al.</i> , 2009 Segelbacher, osobní sdělení, 2009	Cc01, Cc02, Cc03, Cc04, Cc05, Cc06, Cc07 CC1, CC3, CC7, CC9, CC10, CC13
	Volavka žlutozobá ( <i>Egretta eulophotes</i> ) Huang <i>et al.</i> , 2010	Ae01, Ae04, Ae05, Ae09, Ae13, Ae24, Ae25, Ae26, Ae27, Ae28, Ae30, Ae35, Ae36, Ae37, Ae38, Ae42, Ae44, Ae47
	Volavka červenavá ( <i>Egretta rufescens</i> ) Hill <i>et Green</i> , 2011	Er21, Er22, Er23, Er24, Er31, Er41, Er42, Er43, Er44, Er45, Er46, Er51
Dlouhokřídlí	Alkouněk drobný ( <i>Aethia pygmaea</i> ) Dawson <i>et al.</i> , 2005	Apy06, Apy07

Plameňáci	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopterus ruber</i> ) Kapil <i>et al.</i> , 2010	Pruμ 7, Pruμ 8, Pruμ 9, Pruμ 13
	Plameňák růžový ( <i>Phoenicopterus roseus</i> ) Geraci <i>et al.</i> , 2010	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139
Potáplice	Potáplice lední ( <i>Gavia immer</i> ) McMillan <i>et al.</i> , 2004	GimA9, GimA12; GimC5, GimC11, GimD9 GimD12, GimE11
Veslonozi	Faeton běloocasý ( <i>Phaethon lepturus</i> ) Humeau <i>et al.</i> , 2010	P3A3, P3C1, P3D7, P3F3, P3F5, P3F7, P3G12, P3H10, P4F2, P4G1
	Kormorán chocholatý ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> ) Barlow <i>et al.</i> , 2010	Phaari 01, Phaari 02, Phaari 03, Phaari 04, Phaari 05, Phaari 06, Phaari 07, Phaari 08, Phaari 09, Phaari 11, Phaari 12, Phaari 13, Phaari 14, Phaari 15, Phaari 16, Phaari 17
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> ) Fike <i>et al.</i> , 2009 Mercer <i>et al.</i> , 2010	COR 01, COR 03, COR 05, COR 06, COR 07, COR 12, COR 15, COR 17, COR 19, COR 20, COR 21, COR 22, COR 23, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 35, COR 38, COR 40, COR 41, COR 43, COR 45, COR 47 Dcco-01, Dcco-02, Dcco-03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08
	Fregatka malá ( <i>Fregata minor</i> ) Dearborn <i>et al.</i> , 2008	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18
	Terej modronohý ( <i>Sula neboxii</i> ) Faircloth <i>et al.</i> , 2009 Taylor <i>et al.</i> , 2010	BOOB-RM2-F07, BOOB-RM3-D07, BOOB-RM3-F11, BOOB-RM4-A08, BOOB-RM4-B03, BOOB-RM4-C03, BOOB-RM4-D07, BOOB-RM4-E03, BOOB-RM4-E10, BOOB-RM4-F11, BOOB-RM4-G03 Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2A-36, Sn2B-100
	Terej červenonohý ( <i>Sula sula</i> ) Morris-Pocock <i>et al.</i> , 2010	Ss1b-16, Ss1b-51, Ss1b-57, Ss1b-98, Ss1b- 106, Ss1b-142, Ss2b-2, Ss2b-35, Ss2b-48, Ss2b-71, Ss2b-88, Ss2b-92, Ss2b-110, Ss2b- 138, Ss2b-153
	Terej guánový ( <i>Sula variegata</i> ) Taylor <i>et al.</i> , 2010	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-95, Sv2A-152, Sv2B-27, Sv2B-138

### 4.3 Zpracování PCR produktů

PCR produkty byly separovány pomocí vertikální elektroforézy v 6% polyakrylamidovém gelu v denaturačních podmínkách a vizualizovány barvením dusičnanem stříbrným  $\text{AgNO}_3$ . Následující postup je optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

- 1) Obě skla byla důkladně omyta vodou, opláchnuta deionizovanou vodou a 96% etanolem. Delší sklo bylo na ploše, která se dotýkala gelu, ošetřeno přibližně 0,5 ml přípravku pro odpuzování vody ze skel automobilů (Clear Vue Rain Repellent). Kratší sklo bylo na ploše, která se dotýkala gelu, ošetřeno roztokem molekulárního lepidla. Po zaschnutí bylo sklo čtyřikrát opláchnuto 96% etanolem. Na okraje ošetřené strany delšího skla byly položeny 0,4 mm silné spacery a na ně bylo položeno menší sklo ošetřenou plochou dolů.
- 2) Gel byl připraven smísením 6% roztoku akrylamid: N,N'-methylenbisakrylamid 19:1, N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu a nakonec byl přidán 10% roztok peroxidisíranu amonného. Tento roztok gelu byl vypouštěn mezi připravená skla. Po vyplnění celého prostoru mezi skly gelem byl v místě, kde se tento prostor plnil gelem, vsunut hřebínek rovnou stranou přibližně 0,8 cm hluboko mezi skla. Gel se nechal minimálně 1 hodinu polymerizovat.
- 3) Po utuhnutí gelu byla skla uložena do elektroforetické komůrky. Do katodového i anodového prostoru byl nalit 0,5 x TBE pufr. Gel se nechal nahřívat přibližně 35 minut (nastavené hodnoty na zdroji stejnosměrného elektrického proudu: napětí: 3000 V, proud: 150 mA, výkon: 90 W). Po uplynutí této doby byl do prostoru mezi skly vsunut hřebínek zoubky dolu přibližně 1 mm hluboko do gelu. Vzorky se smísily s 5  $\mu\text{l}$  nanášecího pufru a denaturovaly 4 minuty v termobloku nastaveném na 95 °C. Po uplynutí této doby byly mikrozkušavky se vzorky ihned umístěny do ledové tříště.
- 4) Do mezer mezi zoubky hřebínku byly nanесeny pipetou denaturované vzorky (2  $\mu\text{l}$ ). Po napipetování všech vzorků se katodový prostor uzavřel a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu se nastavily příslušné hodnoty (napětí: 3000 V, proud: 150 mA, výkon: 70 W). Čas separace vzorků závisel na molekulárních hmotnostech rozdělovaných PCR produktů.

- 5) Po uplynutí doby elektroforetického dělení PCR produktů byla skla s gelem vyjmuta z komůrky a poté byla od sebe oddělena. Další kroky byly provedeny ve fotomiskách umístěných na třepačce v digestoři a pracovalo se už pouze s kratším sklem umístěným ve fotomisce plochou s gelem nahoru (dále už jen gel).
- Gel byl zalit fix/stop roztokem. Doba trvání fixace byla přibližně 20 minut. Následovalo 3x promytí v deionizované vodě.
  - V dalším kroku byl gel zalit 1% roztokem HNO<sub>3</sub> a nechal se 5 minut působit. Následovalo 4x promytí v deionizované vodě.
  - Dále byl gel zalit 0,1 % roztokem AgNO<sub>3</sub>, do kterého se bezprostředně před použitím přidalo 1,2 ml formaldehydu. Doba působení roztoku byla minimálně 30 minut.
  - Po uplynutí této doby byl gel na několik sekund ponořen do připravené misky s deionizovanou vodou a přemístěn do fotomisky na třepačce s 800 ml vychlazené vývojky.
  - Postupně se vyvíjely hnědočerné proužky PCR produktů. Až byly dostatečně zřetelné, zastavilo se vyvíjení přilítím fix/stop roztoku.
  - V dalším kroku byl gel umístěn na 2 minuty do deionizované vody a poté se nechal 1 hodinu sušit v sušárně nastavené na 60 °C.
- 6) Gel s vizualizovanými produkty se vyhodnotil na negatoskopu a z elektroforetogramů se zjistil počet alel jednotlivých polymorfních mikrosatelitových lokusů. Skla se naskenovala a obrázky se uložily ve formátu png (rozlišení 300 dpi) pro pozdější analýzy.

#### 4.4 Statistické zpracování výsledků

Pro jednotlivé polymorfní mikrosatelitové lokusy, které byly testovány na všech 23 jedincích, se stanovila následně jejich detailní charakteristika. K tomu účelu byly použity dva populačně-genetické programy – Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.0.10 (Rousset, 2008).

Pomocí programu Cervus 3.0.3 se zjišťovala očekávaná heteozygotnost, zda jsou lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze, přítomnost nulových alel a zjištění

spolehlivosti při detekování paternity. Pomocí programu Genepop 4.0.10 se zjišťovalo, zda mezi lokusy není vazebné spojení.

## 4.5 Chemikálie

Akrylamid (AppliChem)

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

Bromfenolová modř (Serva)

Clear Vue Rain Repellent (Turtle WAX)

Deionizovaná voda

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

Dusičnan stříbrný (Lachema)

Ethanol – 96% roztok (lihovar Vrbátky)

Formaldehyd (Lachema)

Formamid (Lachema)

Kyselina boritá (Lachema)

Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)

Kyselina octová – ledová (Lachema)

3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

Močovina (Lachema)

N,N'-metylenbisakrylamid (AppliChem)

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

Peroxodisíran amonný (Serva)

Thiosíran sodný (Lachema)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)

Uhličitan sodný (Lachema)

Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

## 4.6 Použité roztoky

### Fix/stop roztok

- 80 ml ledové kyseliny octové, 800 ml deionizované H<sub>2</sub>O

### Molekulární lepidlo

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

### Nanášecí pufr pro elektroforetickou separaci

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

### 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' - tetramethylethylendiaminu

### Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného $\text{AgNO}_3$

- 0,8 g  $\text{AgNO}_3$ , 800 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

### Roztok 1% kyseliny dusičné $\text{HNO}_3$

- 12 ml 65%  $\text{HNO}_3$ , 800 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$

### Roztok 10% peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

- 1 g peroxodisíranu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  rozpustit v 10 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$
- uchovat v mikrozkuvkách po 400 µl v  $-20\text{ }^\circ\text{C}$

### Vývojka

- 24 g uhličitanu sodného  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 800 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$  a vychladit na teplotu pod  $10\text{ }^\circ\text{C}$
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

### Zásobní roztok 6% akrylamidu

- 420 g močoviny, 484 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$ , 50 ml 10 x TBE, 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N,N'-metylenbisakrylamid 19:1
- po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné lahvi ve  $4\text{ }^\circ\text{C}$

### Zásobní 40% roztok akrylamidu : N,N'-metylenbisakrylamidu 19:1

- 380 g akrylamidu a 20 g N,N'-metylenbisakrylamidu rozpustit v 500 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$ , objem doplnit na 1 l, roztok uložit v temné lahvi ve  $4\text{ }^\circ\text{C}$

### Zásobní roztok 10x TBE pufr

- 108 g Tris, 55 g kyseliny borité  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 40 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 mol/l, pH 8,0 a doplnit deionizovanou vodou na 1 l

## 4.7 Laboratorní pomůcky a přístroje

Elektroforetický zdroj:	EV232 (Consort)
Elektroforetický zdroj:	ECPS 3000/150 (Pharmacia)
Laboratorní váhy:	Mark S 622 (BelEngineering)
Magnetická míchačka:	MR Hei-Combi (Heidolph)
Mikropipety:	Finnpipette 0,5-10 $\mu$ l (osmikanálová) a 0,3 $\mu$ l-1 ml (ThermoLabsystem)
Mikropipety:	Nichipipet EX 0,5 $\mu$ l-1 ml (Nichiryo)
Minicentrifuga:	CLE CSQSP (Clever Scientific Ltd)
Minicentrifuga:	Spectrafuge Mini (Labnet)
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)
Výrobník deionizované a ultračisté vody:	typ 02 (AquaOsmotic)
Výrobník ledu:	Icematic F100 Compact (Castel Mac)

## **5 VÝSLEDKY**

.







































## **6 DISKUZE**

7









## 11 ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem otestovala na DNA čápa bílého (*Ciconia ciconia*) 210 *cross-species* párů primerů. 198 párů bylo pro analýzu polymorfismus u čápa bílého použito poprvé, zbylých 12 párů primerů bylo pro ověření znovu retestováno, jelikož poskytly polymorfní produkt u blízce příbuzného druhu čápa černého (*Ciconia nigra*). Celkem jsem objevila 14 polymorfních lokusů, které byly odvozeny z DNA od taxonomicky příbuzných druhů pocházejících z řádů brodivých, dlouhokřídlých, plameňáků, potáplic a veslonohých.

Následně jsem provedla genotypizaci těchto 14 polymorfních mikrosatelitových lokusů na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého spolu s 20 mikrosatelitovými lokusy, které byly nalezeny v mé předchozí bakalářské práci (Obručová, 2009). U dvou dvojic lokusů z těchto 20 mikrosatelitů jsem potvrdila ortologní mikrosatelity (pro další analýzu jsem vybrala vždy jeden z nich) a jeden mikrosatelit jsem vyhodnotila jako monomorfní. Pomocí statistických programů Cervus 3.0.3 a Genepop 4.0.10 jsem analýzou genotypizačních dat získala detailní charakteristiku všech polymorfních lokusů. Na základě zjištěných charakteristik jsem následně vybrala 7 lokusů, které jsou vhodné pro budoucí analýzu příbuzenských vztahů, zejména pak determinaci paternity u čápa bílého.

Mezi třemi mikrosatelitovými lokusy jsem našla silnou fyzickou vazbu. U těchto lokusů společně ještě s jedním mikrosatelitem jsem objevila vazbu na pohlaví. Ve třech případech na pohlavní chromozom Z a u jednoho není způsob vazby na pohlavní chromozom jasný. Další analýza by byla nad rámec této diplomové práce. Dále jsem testovala polymorfismus několika mikrosatelitových lokusů popsanych přímo u čápa bílého a zjistila jejich charakteristiky.

## 12 POUŽITÁ LITERATURA

- ANONYMOUS (2011): The IUCN Red List of Threatened Species™, version 2011.1. Publikováno online: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org), navštíveno dne 18.7.2011.
- ARDEN, R.W., JONES, A.G. (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* (12), 2511 – 2523.
- 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.
- BROWN, L.H., URBAN, E.K., NEWMAN, K. (1982): The birds of Africa. Vol. 1, Academic Press, London.
- CAHLÍKOVÁ, R. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- CARRASCAL, L.M., BAUTISTA, L.M., LAZARO, E. (1993): Geographical variation in the density of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain: influence of habitat structure and climate. *Biological Conservation* (65), 83 – 87.
- CROW, J.F., KIMURA, M. (1970): An Introduction to Population Genetics Theory. Harper & Row, New York.
- CUADRADO, A., SCHWARZACHER, T. (1998): The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* (107), 587-594.
- DAWSON, D.A., BURKE, T., HANSSON, B., PANDHAL, J., HALE, M.C., HINTEN G.N., SLATE, J. (2006): A predicted microsatellite map of the passerine genome based on chicken-passerine semence similarity. *Molecular Ecology* (15), 1299-1320.
- DAWSON, D.A., HUNTER, F.M., PANDHAL, J., BUCKLAND, R., PARHAM, A., JONES, I.L., BRADSHAW, M., JEHLER, R., BURKE, T. (2005): Assessment of 7 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5-15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes* (5), 289-297.
- DEARBORN, D.C., HAILER, F., FLEISHER, R.C. (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* (8), 1399-1401.
- DEL HOYO, J., ELLIOT, A., SARGATAL, J. (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Barcelona, Lynx Edicions.
- DI RENZO, 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.
- 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.



- ESTOUP, A., COURNET, J.M. (1999): Microsatellite evolution: interferences from population data. In *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, NY, 49 – 65.
- FAIRCLOTH, B.C., RAMOS, A., DRUMMOND, H., GOWATY, P.A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *Conservation Genetic Resources* (1), 159-162.
- FIELD, D., WILLS, C. (1996): Long, polymorphic microsatellite in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society Series B* (263), 209-215.
- FIKE, J.A., DEVAULT, T.L., RHODES, O.E. (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* (9), 1138-1185.
- FLEGR, J. (2005): *Evoluční biologie*. Academia, Praha.
- GERACI, J., GAILLARD, M., BECHET, A., CEZILLY, F., WATTIER, R.A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- GOLDSTEIN, D.B., SCHLOTTERER, C. (1999): *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, NY.
- GRIFFITH, S.C., OWENS, I.P., THUMAN, K.A. (2002): Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* (11), 2195-2212.
- NÁDVORNÍK, P., UVÍROVÁ, L., PAVEL, V., BUREŠ, S. (2005): Microsatellite markers for the study of paternity in the meadow pipit (*Anthus pratensis*). *Journal of Applied Biomedicine, Supplement 1 (Cells VI)*, České Budějovice, 35-36.
- HANCOCK, J.M. (1999): Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: *Microsatellites, Evolution and Applications*. Oxford University Press, NY, 1-9.
- HAMADA, H., PETRINO, M.G., KAKUNAG, T., (1982): A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* (79), 6465-6469.
- HAMADA, H., SEIDMAN, M., HOWARD, B.H., GORMAN, C.M. (1984): Enhanced gene expression by the poly (dT-dG).poly(dC-dA) sequence. *Molecular and Cellular Biology* (4), 2622-2630.
- HARDING, R.M., BOYCE, A.J., CLEGG, J.B. (1992): The evolution of tandemly repetitive DNA: Recombination rules. *Genetics Society of America* (132), 847-859.
- HARDING, R.M., BOYCE, A.J., MARTINSON, J.J., FLINT, J., CLEGG, J.B. (1993): A computer simulation study of VNTR population genetics: Constrained recombination rules out the infinite alleles model. *Genetics Society of America* (135), 911-922.
- HILL, A., GREEN, M.C. (2011): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* (3), 13-15.
- HOFFMAN, E.K., TRUSKO, S.P., MURPHY, M., GEORGE, D.L. (1990): An S1 nuclease sensitive homopurine/homopyrimidine domain in the c-Ki-ras promoter

- interacts with a nuclear factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (87), 2705-2709.
- HUANG, X., ZHOU, X., CHEN, M., FANG, W., CHEN, X. (2010): Isolation of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics* (11), 1211-1214.
- HUDEEC, K. a kolektiv (1994): Fauna ČR a SR, Svazek 27, Ptáci – Aves Díl 1., Academia, 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.
- JARNE, P., LAGODA, J.L.P. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* (11), 424-429.
- JURKA, J., KAPITONOV, V., KOHANY, O., JURKA, M. (2007): Repetitive Sequences in Complex Genomes: Structure and Evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (8), 241-259.
- KAHL, G., MEKSEM, K. (2005): The handbook of plant genome mapping, genetic and physical mapping. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- KALINOWSKI, S.T., TAPER, M.L., MARSHALL, T.C. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* (16), 1099-1106.
- KAPIL, R., SAWYER, G.M., PRESTON, L., BENJAMIN, R.C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber*). *Molecular Ecology Resources*. Preprint.
- KIMURA, M., CROW, J.F. (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* (49), 725-738.
- KIMURA, M., OHTA, T. (1978): Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (75), 2868-2872.
- KOČÁREK, E. (2008): Pohlavní rozmnožování a meióza. Sborník textů - Vybrané aspekty lékařské genetiky. Ústav dědičných metabolických poruch Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.
- KORETH, J., O'LEARY, J.J., MCGEE, J.O'D. (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis: a review. *Journal of Pathology* (178), 239-248.
- KUNST, C.B., LEEFLANG, E.P., IBER, J.C, ARNHEIM, N.A., WARREN, S.T. (1997): The effect of FMR1 CGG repeat interruptions on mutation frequency as measured by sperm typing. *Journal of Medical Genetics* (34), 627-631.
- LEVINSON, G., GUTMAN, G.A. (1987): Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* (4), 203-221.
- LI, Y.C., 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* (6), 991-1007.
- LUTY, J.A., GUO, Z., WILLARD, H.F., LEDBETTER, D.H., LEDBETTER, S., LITT, M. (1990): Five polymorphic microsatellite VNTRs on the human X chromosome. *American Journal of Human Genetics* (46), 776-783.
- MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUK, L.E.B, PEMBERTON, J.M. (1998): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* (7), 639-655.
- MCCMILLAN, A.M., BAGLEY, M.J., EVERS, D.C. (2004): Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). *Molecular Ecology Notes* (4), 297-299.
- MERCER, D.M., HAIG, S.M., MULLIS, T.D. (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources*. Online First.
- METZGAR, D., BYTOF, J., WILLS, CH. (2000): Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* (10), 72-80.
- MIKULOVÁ, V. (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- 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.
- NAVRÁTILOVÁ, J. (2009): Polymorfní 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., PADUA, J.G., ZUCCHI, M.I., VENKOVSKY, R., VIEIRA, C.M.L. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* (29), 294-307.
- OLSSON, O. (2007): Genetic origin and success of reintroduced white storks. *Conservation Biology* (21), 1196-1206.
- OPATRŇY, E. (2003): Fylogeneze a systém strunatců (Repetitorium). Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc.
- PLESNÍK, J., HANZAL, V., BREJŠKOVÁ, L. (2003): Červený seznam ohrožených druhů České republiky, Obratlovci. Praha.
- PRIMMER, C.R., PAINTER, J.N., KOSKINEN, M.T., PALO, J.U., MERILA, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* (36), 348-360.

- PRIMMER, C.R., RAUDSEPP, T., CHOWDHARY, B.P., MØLLER, A.P., ELLEGREN, H. (1997): Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research* (7), 471-482.
- PROCTOR, N.S., LYNCH, P.J. (1993): *Manual of ornithology: avian structure and function*. Yale university Press. Yale.
- RASHMANN K., SCHLOTTERER, C., TAUTZ, D. (1991): Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* (12), 113-118.
- REICHARD, U., BOESCH, C. (2003): *Monogamy – Mating Strategies and Partnerships in Birds, Human and Other Mammals*. Cambridge University Press, Cambridge.
- REJMAN, B., LACINA, D. (2002): Výsledky monitoringu hnízdní populace čápa bílého (*Ciconia ciconia*) v České republice. *Sylvia* (38), 103 – 111.
- 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., GONCALVES, E.C., BARBOSA, M.S.R., SILVA, A., SCHNEIDER, M.P.C. (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes* (6), 307-309.
- 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, 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.
- SHARMA, P.C, GROVER, A., KAHL, G. (2007): Minig microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology* (25), 490-498.
- SHELDON, F.H., SLIKAS, B. (1997): *Advances in Ciconiiform Systematics 1976-1996*. *Colonial Waterbirds* (20), 106-114.
- 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.
- SKLENÁŘOVÁ, K. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u volavčíka člunozobého (*Cochlearius cochlearius*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- ŠŤASTNÝ, K., BEJČEK, V., HUDEC, K. (2006): *Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice 2001-2003*. Aventinum, Praha.
- TAYLOR, S.A., MORRIS-POCOCK, J.A., SUN, Z., FRIESEN, V.L. (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* (151), 525-528.
- TOMASULO-SECCOMANDI, A.M., SCHABLE, N.A., BRYAN, A.L. JR., BRISBIN, I.L. JR., DEL LAMA, S.N., GLENN, T.C. (2003): Development of microsatellite DNA

- loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* (3), 563-566.
- TORTOSA, F.S., REDONDO, T. (1992): Frequent Copulations Despite Low Sperm Competition in White Storks (*Ciconia Ciconia*). *Behaviour* (121), 288 – 314.
- TÓTH, G., GÁSPÁRI, Z., JURKA, J. (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* (10), 967-981.
- VALDES, A.M., SLATKIN, M., FREIMER, N.B. (1993): Allele Frequencies at Microsatellite Loci: The Stepwise Mutation Model Revisited. *Genetics Society of America* (133), 737-749.
- WEBER J.L., MAY, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics* (44), 388-396.
- WEBER, J.L., WONG, C. (1993): Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* (2), 1123-1128.
- WIERDL, M., GREENE, CH.N., ROBERTSON, J.S., PETES, T.D. (1996): Destabilization of Simple Repetitive DNA Sequences by Transcription in Yeast. *Genetics Society of America* (143), 713-721.
- ZANE, L., BARGELLONI, L., PATERNELLO, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* (11), 1-16.
- ZIELIŃSKI, P. (2002): Brood reduction and parental infanticide — are the White Stork *Ciconia ciconia* and the Black Stork *Coconia nigra* exceptional? *Acta Ornithologica* (37), 113-119.

## 13 SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů ( <i>Amplified fragment length polymorphism</i> )
bp	pár bází ( <i>base pair</i> )
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
IAM	mutační model nekonečných alel ( <i>infinite allele model</i> )
IUCN	mezinárodní sdružení ochrany přírody ( <i>International Union for Conservation of Nature</i> )
EPC	mimopárová kopulace ( <i>extra-pair copulation</i> )
G	guanin
H <sub>E</sub>	očekávaná heterozygotnost ( <i>expected heterozygosity</i> )
H <sub>O</sub>	pozorovaná heterozygotnost ( <i>observed heterozygosity</i> )
KAM	model <i>K</i> -alely ( <i>K-allele model</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
RAPD	amplifikace polymorfnní DNA náhodná ( <i>random amplified polymorphic DNA</i> )
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
SNP	jednonukleotidové polymorfismy ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SMM	krokový mutační model ( <i>stepwise mutation model</i> )
SSRs	opakování jednoduchých sekvencí ( <i>simple sequence repeats</i> )
STRs	krátké tandemové repetice ( <i>short tandem repeats</i> )
T	tymin
T <sub>a</sub>	teplota annealingu ( <i>annealing temperature</i> )
TPM	dvoufázový mutační model ( <i>two phase model</i> )