

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE

FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV

Katedra genetiky a plemenárskej biológie

**Využitie DNA analýz pre hodnotenie genofondu ohrozených
druhov zvierat.**

Autoreferát dizertačnej práce
na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor
vo vednom odbore 15-03-9 Genetika - Genetika živočíchov

Ing. Jaroslav Pokorádi

Nitra, 2006

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre genetiky a plemenárskej biológie Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: Ing. Jaroslav Pokorádi
Katedra genetiky a plemenárskej biológie
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: prof. Ing. Alojz Kúbek, CSc.
Katedra genetiky a plemenárskej biológie
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Oponenti: prof. Ing. Josef Dvořák, CSc.
Ústav morfológie, fyziológie a genetiky zvierat
Mendelova poľnohospodárska a lesnícka univerzita v Brne, ČR

Prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc.
Katedra fyziológie živočíchov
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Doc. Ing. Peter Chrenek, PhD.
Ústav genetiky a reprodukcie hosp. zvierat
Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, Nitra

Autoreferát bol odoslaný dňa

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra genetiky a plemenárskej biológie Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Obhajoba doktorandskej dizertácie sa koná
pred komisiou pre obhajobu dizertačných práce vedného odboru 15-03-9 Genetika - Genetika živočíchov na Fakulte agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Miesto konania: Katedra genetiky a plemenárskej biológie
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť: knižnica katedry, č.d. 35

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov.

Predseda komisie pre obhajobu vo vednom odbore 15-03-9 Genetika – Genetika živočíchov.

Prof. Ing. Alojz Kúbek, CSc.
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

ABSTRAKT

Pre zistenie možnosti aplikácie molekulárno-genetických metód analýzy DNA na identifikáciu jedincov a hodnotenie biodiverzity ohrozených druhov zvierat bola použitá minisatelitná sonda 33.6, mikrosatelitné primery a RAPD primery. Ako model boli vybraté populácie jedincov z čeľade sokoloviré a turovité. Z čeľade sokolovitých bolo testovaných 115 exemplárov. Z čeľade turovitých bolo testovaných spolu 19 exemplárov a to Adax núbijský (*Addax nasomaculatus*) 9 exemplárov a Koza skrutkorohá (*Capra falconeri heptneri*) 10 exemplárov. Matematicko-štatistické spracovanie výsledkov variability DNA markérov sa robili použitím softvéru PowerMarker.

Pri jedincoch z čeľade sokolovité sa získali aplikáciou sondy 33.6 fingerprinty z 37 detekovateľnými frakciami a pri jedincoch z čeľade turovité u kozy skrutkorohej a adaxa nubijského 42 frakcií. Fragmentačnou analýzou boli testované 4 mikrosatelity u sokolovitých NVHfp13-4 alely, 31-10 alel, 79-4 – 13 alel a 89 - 7 alel. Pri turovitých boli použité mikrosatelitné primery pre 8 lokusov – HSC, INRA0063, SRCRSP0024, ILST019, INRA0005, MAF0065, SRCRSP0005, SRCRSP0008 pri ktorých bolo zistených 36 alel z ktorých bolo možné zostaviť 46 genotypov využiteľných pre hodnotenie zastúpených jedincov. Metódou RAPD boli použité 4 oligonukleotidové primery u sokolovitých pri ktorých bolo detekovaných 24 frakcií a u turovitých 38 frakcií.

Použité metódy založené na polymorfizme náhodne amplifikovaných fragmentov, mikrosatelitných a minisatelitných tandemových opakovaní poskytli dostatočne veľký priestor pre identifikáciu jedincov a pre hodnotenie vnútro populačných analýz. Všetky postupy a výsledky sú v práci diskutované.

Kľúčové slová: genotyp, primer, vnútro populačná analýza

ABSTRACT

Obtaining possibility of molecular – genetics analyze methods of DNA application for individuals identification and biodiversity of endangered animal species evaluation was used minisatellite probe 33.6, microsatellite primers and RAPD primers. Individuals from the family of Falconidae and Bovidae were chosen as model animals. Individuals from the family of Falconidae were tested in amount of 115 exemplars and from the family of Bovidae were tested 10 exemplars of *Capra falconeri heptneri* and 9

exemplars of *Addax nasomaculatus*. Mathematic- statistically elaboration of the DNA markers variability was proved by software PowerMarker.

My means of the probe 33.6 applications at individuals from family Falconidae were obtained fingerprints with 37 detected fragments and in the samples of individuals from the family Bovidae 42 fragments. Using fragmentation analyze were tested 4 microsatellite at the individuals of Falconidae: NVHfp13-4 alleles, 31-10 alleles, 79-4 – 13 alleles and 89 - 7 alleles. Bovidae individuals were tested by using microsatellite primers for 8 loci: HSC, INRA0063, SRCRSP0024, ILST019, INRA0005, MAF0065, SRCRSP0005, SRCRSP0008 where determined 36 alleles out of which was possible to create 46 genotypes usable for evaluation tested individuals.

RAPD methods used 4 oligonucleotide primers and were detected in samples of Falconidae 24 fragments and in samples of Bovidae 38 fragments.

Used methods based on polymorphism random amplified fragments, microsatellite and minisatellite tandem repeats provided suitable scope for evaluation of intrapopulation analyses. All of the procedures and results are discussed in the work.

Key words: genotype, primer, intrapopulation analyze

POUŽITÉ SKRATKY, SYMBOLY A ZNAČKY

bp	bázový pár
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
ELFO	elektroforéza
F	koeficient príbuznosti
H	heterozygotnosť
<i>Hae</i> III	reštrikčná endonukleáza
<i>Hin</i> I	reštrikčná endonukleáza
ISAG	Medzinárodná spoločnosť pre genetiku zvierat
MS	mikrosatelitný markér
PIC	Informačný obsah polymorfizmu
RAPD	polymorfizmus náhodne amplifikovaných úsekov DNA
RFLP	polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov
RTG	röntgen
VNTR	polymorfizmus variabilného počtu tandemových opakovaní

Ú V O D

Ochrana biodiverzity a životného prostredia je v tomto tisícročí neoddeliteľnou súčasťou politiky vyspelých štátov sveta. Pokrokom vedy dokážeme jednotlivé formy života monitorovať, chrániť, vytvárať génové rezervy druhov, ktoré už vyhynuli, resp. môžu v krátkej dobe vyhynúť. Ucelené systémové prepojenie poznatkov molekulárnej genetiky a ekológie môže viesť k záchrane druhovej skladby na našej planéte.

Základom pre dnes používanú metódu genetického odtlačku je DNA fingerprint mikrosatelitných a minisatelitných tandemových opakovaní. Rýchly rozvoj molekulárno-genetických metód v poslednom desaťročí má za následok aplikáciu genetického výskumu do záchrany nízko populačných rastlinných a živočíšnych druhov, ktorých génová rezerva je obmedzená. Vytvárajú sa záchranné programy in situ pre zabezpečenie dostatočnej génovej rezervy pre neskoršiu reintrodukciiu do voľnej prírody. Tento integračný proces vyžaduje prítomnosť molekulárnej genetiky, ktorá zaručí genetickú nepříbuznosť jedincov, eliminuje inbreeding a tým zabezpečí pre budúce generácie dostatočnú kvalitnú výbavu primárnych introdukčných populácií.

Výsledky tejto práce boli vykonávané v rámci riešenia výskumných projektov na Katedre genetiky a plemenárskej biológie Slovenskej poľnohospodárskej univerzity Nitra v spolupráci s ďalšími inštitúciami na Slovensku a v ČR. Predkladaná práca je súčasťou časti výsledkov výskumného projektu APVT 20-006102 Využitie biotechnologických metód pre šľachtenie, výživu a ochranu biodiverzity v špeciálnych odvetviach živočíšnej výroby.

PREHĽAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Genetický polymorfizmus DNA

Genetický polymorfizmus (variabilitu) možno študovať pomocou rôznych metodologických postupov. Podľa nich môžeme polymorfizmus rozdeliť do troch základných vedných oblastí: biochemická genetika, imunogenetika živočíchov a molekulárna genetika.

Polymorfizmus minisatelitnej DNA

V minisatelitnej DNA ide o motívy v sekvencii dlhej 20-60 nukleotidov, ktoré sa opakujú 1000x až 100000x. Enormný minisatelitný polymorfizmus je využívaný v DNA fingerprintingu, pretože medzi nepríbuznými jedincami nemožno nájsť identický vzor opakovania. Tieto vzory rozštiepenej minisatelitnej DNA sú svojou zložitou podobou od tlačkou papilárnej línie. Zložité vzory pruhov sú preto označované ako DNA finger-prints (angl. finger = prst, print = tlač). DNA fingerprinty sú súčasne nahradzované využívaním polymorfizmu mikrosatelitnej DNA, resp. súbežne sa využíva polymorfizmus oboch repetitívnych sekvencií (Griffiths et al., 1998, 2000). Minisatelity pozostávajúce z rôzneho počtu opakovaní sú podkladom Southernovej metódy, ktorá spočíva v tom, že fragmenty získané štiepením DNA pomocou reštrikčných endonukleáz sa pomocou elektroforézy separujú na základe dĺžky v agarózovom géle (Southern, 1975, 1979).

Jeffreys et al. (1987, 1988) prví definovali použitie minisatelitných sond pre identifikáciu stavovcov. Touto problematikou sa zaoberali aj Marinelli et al. (1992), ktorí metódu DNA fingerprinting aplikovali na určovanie paternity pri ondatrách. Rozsiahle využitie DNA fingerprintingu pre genetické mapovanie populácií, detekciu príbuzenských vzťahov a genetických vzdialeností medzi populáciami domestikovaných a voľne žijúcich živočíchov popísali Burke et al. (1987).

Hanotte et al. (1991) a Grunder et al. (1994) opisovali vo svojich prácach využitie hypervariabilných minisatelitných sekvencií 33.6 a 33.15 pri medzidruhových rozdieloch vtákov (indický páv, hus).

Široké využitie DNA fingerprintingu pre popísanie genetických odlišností popísali Kuhnlein et al. (1989, 1991). Russel et al. (1993) popísali optimalizovanú metodiku využitia DNA fingerprintingu pri genetickom monitoringu laboratórnych potkanov a myší. Haberfeld et al. (1991) využíval DNA fingerprinting pre detekciu a vytváranie genómovej knižnice pre farmové zvieratá. Vo svojej práci porovnávali účinnosť rôznych typov minisatelitných a mikrosatelitných sond. Konštatovali, že použitím DNA sondy pre hydinu R18.1 bol dosiahnutý vysoký stupeň polymorfizmu aj pri ovciach. Použitá bola reštrikčná endonukleáza HinfI. Hlavný význam ich práce spočíval v porovnaní mini a mikro satelitných systémov. Vysoký stupeň polymorfnosti vykazovali minisatelitné sondy 33.6, 33.15, bakteriofág M13 a prasačí repetitívny klon pS3. Z mikrosatelitných sond boli publikované poly(GT), oligonukleotidová sonda

(CAC)₅, (GAC/TA)₄ a (GT)₁₂. Bruford a Burke (1994) popísali distribúciu sond 33.6 a 33.15 v populácii genómu kúr domácich. Pereira et al. (1996) použili Jeffreysové ľudské minisatelitné sondy 33.6 a 33.15 pre identifikáciu jedincov brazílskych ohrozených druhov vtákov z čeľade Cracidae – Papile jacutinga a porovnávali jedincov z voľnej prírody s jedincami chovanými v zajatí. Wickings (1995) popísal kolóniu západoafrických opíc druhu *Mandrillus sphinx* pomocou minisatelitných sond 33.6 a 33.15. Hlavným cieľom bolo zistiť paternitu potomkov populácie opíc nachádzajúcich sa na rozlohe 6 ha dažďového pralesa. Domingo-Roura et al. (1997) pomocou 33.6 detekovali 27 jedincov chráneného druhu rysa červeného (*Lynx rufus*) a zisťovali geografickú a genetickú identifikáciu jedincov s ich prirodzeným biotopom.

Polymorfizmus mikrosatelitnej DNA

Podstatou tohto polymorfizmu je opakovanie jednoduchých motívov v sekvenciách bez detekcie štiepenia reštriktázami. Rozlíšenie mikrosatelitných jednotiek sa deje na základe krátkych jedinečných sekvenciách, ktoré vymedzujú mikrosatelitné sekvencie (priľahlé, premost'ujúce – angl. flanking sequences). Pokiaľ je polymorfizmus určitého mikrosatelitu spoľahlivo detekovateľný a preverený tak, že poskytuje v populácii optimálnu informačnú hodnotu (tzv. PIC – polymorphic information contents), detekciu môžeme automatizovať (Hruban, 1999). Nesje et al. (2000a, 2000b) pomocou detekovaných mikrosatelitov určili príbuzenské vzťahy u sokola rároha v Nórsku. Rovnako boli detekované známe mikrosatelity pre sokola tmavého a ostatné druhy dravcov (Nesje a Roed, 2000).

Maudet et al. (2004) testovali 60 publikovaných mikrosatelitov ako štandardný set polymorfných znakov pre ohrozené druhy kopytníkov z čeľade Bovidae (dobytok, kozy, ovca). Testovaných bolo 49 jedincov z 11 taxónov, z čoho 6 boli divo žijúce druhy kôz (*Capra spp.*). Vhodnosť metódy detekcie mikrosatelitných markérov potvrdil aj Martinez-Cruz et al. (2002), ktorí popísali 18 polymorfných mikrosatelitných markérov pre ohrozený druh orla kráľovského španielskeho.

Polymorfizmus náhodne amplifikovaných fragmentov DNA

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) je technika umožňujúca rýchlu detekciu polymorfizmu v genóme, založená na amplifikácii oblastí genómu použitím krátkych oligonukleotidových primerov (10-12 nukleotidov) „náhodnej“ (arbitrary) sekvencie (Williams et al., 1990). Na RAPD amplifikáciu sa používa ako templát genómová DNA a ako primer je použitý oligonukleotid ľubovoľnej sekvencie.

Výsledkom je amplifikácia niekoľkých diskretných produktov DNA. RAPD markéry sa zaraďujú medzi skupinu II (Dodgson,1997). RAPD analýza je široko využiteľná na rôzne aplikácie ako je mapovanie génov, detekcia diverzity reťazca DNA, analýza taxonomických vzťahov (Vašíček, 1998).

CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bola optimalizácia molekulárno-genetických metód stanovenia DNA profilu chránených druhov živočíchov pre určenie identity, druhovej príslušnosti a parentity. Všeobecne boli jednotlivé ciele zhrnuté do nasledovných celkov:

- optimalizácia molekulárno-genetických metód vybraných druhov vtákov a cicavcov vhodných pre stanovenie DNA profilu,
- identifikácia jedincov stanovením DNA profilu v rámci druhu,
- stanovenie princípov tvorby DNA databázy chránených druhov zvierat a archivácia DNA.

Použitie metód založených na polymorfizme náhodne amplifikovaných frragmentov, mikrosatelitných a minisatelitných tandemových opakovaní je predmetom dosiahnutia cieľov našej práce a hlavnou oblasťou využitia by mal predstavovať výsledok v podobe DNA profilu, ktorý bude mať vysokú vypovedaciu schopnosť, vysoký stupeň polymorfnosti a možnosť opakovateľnosti.

MATERIÁL A METÓDY

Všeobecné postupy pre všetky analýzy

Experimentálne zvieratá

Bolo testovaných 7 druhov a medzidruhových krížencov vtákov a to z čeľade sokolovitých (Falconidae). Z radov cicavcov boli testované druhy koza skrutkorohá (*Capra falconeri heptneri*) a adax núbijsky (*Addax nasomaculatus*) z čeľade turovitých (Bovidae). Z čeľade sokolovité boli spolu testovaných 115 exemplárov, ktorých sme rozdelili podľa druhovej a medzidruhovej príslušnosti *Falco peregrinus*/sokol s'ahovavý (FPA), *Falco cherrug*/sokol rároh (FCA), *Falco biarmicus*/sokol tmavý (FBA), *Falco tinnunculus*/sokol myšiar (FTA) a medzidruhové krížence *Falco cherrug*/*Falco rusticolus* (FCH), *Falco rusticolus*/*Falco cherrug* (FRH), *Falco peregrinus*/*Falco cherrug* (FPH). Z čeľade turovitých bolo testovaných spolu 19 exemplárov a to adax núbijský (*Addax nasomaculatus*) – počet testovaných jedincov 9 a koza skrutkorohá (*Capra*

falconeri heptneri) – počet testovaných jedincov 10. Označenie kôž skrutkorohých bolo od KA1 do KA13 a adaxov nubíjských od KA14 do KA22.

Odber vzoriek z biologických materiálov

Biologické vzorky pre izoláciu DNA predstavovala krv, boli použité aj chlpové cibulky (možnosť pri cicavcoch), perie alebo páperie pri vtákoch, povrchová vrstva kutánnej sliznice, prípadne časti povrchových epitelov. Krv bola odobraná pri cicavcoch z vena jugularis. Pri vtákoch bol odber krvi realizovaný z vena cutanea ulnaris. Pre izoláciu dostatočného množstva DNA postačuje odobrať krv v objeme 500 µl pri cicavcoch a 200 µl krvi pri vtákoch.

Izolácia genómovej DNA

Pri cicavcoch bola genómová DNA izolovaná z lymfocytov periférnej krvi odobratej do roztoku s 3,8 % citrátom sodným (môže byť použitý aj EDTA). Pri vtákoch bola okrem lymfocytov izolovaná DNA aj z erytrocytov.

Izolácia genómovej DNA cicavcov

Na izoláciu DNA z krvi bola použitá metóda proteolytickej hydrolýzy proteinázou K, fenol-chloroformovej deproteinizácie a etanolovej precipitácie DNA (Sambrook J. et al., 1989). Na izoláciu genómovej DNA z chlpových cibuliek bol použitý termocykler do ktorého sa umiestnili skúmavky, kde okrem chlpových cibuliek bol pridaný lyzačný roztok v objeme 100 µl. V termocyklery prebiehala lýza buniek a to v cykle: 65°C - 30 minút, 94°C -15 minút a 20°C - 10 minút.

Izolácia genómovej DNA vtákov

Pre väčšiu koncentráciu DNA vtácej krvi bola potrebná modifikácia samotnej metódy izolácie DNA. Pre izoláciu DNA z krvi boli použité dve metódy: modifikovaná metóda podľa Wettona (1994), ktorej podkladom je metóda proteolytickej hydrolýzy proteinázou K, fenol-chloroformovej deproteinizácie a etanolovej precipitácie DNA. Druhá modifikovaná metóda vysolovania podľa Helmsa (1990) je upravenou metódou vysolovania DNA, ktorá bola aplikovaná aj na izoláciu cicavčej genómovej DNA. Podstatou tejto metódy bola vysoká koncentrácia solí (NaCl), ktorá pôsobí deproteinizačne. Izolácia genómovej DNA z peria je rovnaká ako z chlpových cibuliek.

Elektroforéza na agarózovom géle

Elektroforéza je fyzikálno – chemická metóda delenia látok v elektrickom poli. Pohyb koloidných častíc, makromolekúl alebo i samostatných molekúl v elektrickom poli (rýchlosť/čas) závisí od vlastností danej molekuly a taktiež od vlastností nosiča

a prostredia, v ktorom je pohyb. Vizualizácia PCR produktov bola vykonaná pomocou interkalačného činidla etídium bromid.

Vyhodnotenie a archivácia DNA profilov

Hlavný význam vyhodnotenia DNA bol pri samotnej identifikácii jedinca z DNA databázy, resp. potvrdenia rodičovstva. Pre účely našej práce sme na štatistické vyhodnotenie použili program PowerMarker 3.25 (Liu, www.powermarker.net) v ktorom bolo možné vyhodnocovať získané profily na báze populačno genetických metód a rovnako celkovo zhodnotiť genetickú vzdialenosť a zostrojiť prislúchajúci dendrogram.

Špecifické postupy pre jednotlivé analýzy

PCR

Polymerázová reakcia bola vykonávaná v termocykleri PTC 200 (MJ Research). Na amplifikáciu náhodných úsekov DNA (pri RAPD) boli použité následovné oligoprimery: la02, 1_/_3, 1_/_5 a la03.

Na zistenie polymorfizmu sekvencií mikrosatelitnej DNA bola použitá fluorescenčná fragmentačná analýza kapilárnou elektroforézou (ABI PRISM 310TM Genetic Analyser (Applied Biosystems, Perkin-Elmer)) a na vyhodnotenie bol využitý software Genescan 2.1 a Genotyper 2.0. Fragmentačná analýza bola vykonaná na Ústave genetiky, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brne, ČR.

Názov primeru pre RAPD: 1_/_3, sekvencia (5'-3'): GAAACAGCG T; názov primeru: 1_/_5, sekvencia (5'-3'): GAGTCACGA G; názov primeru: la02, sekvencia (5'-3'): TGAGGGCTG T; názov primeru: la03, sekvencia (5' - 3'): CCCGTGCGA G.

Pre mikrosatelitnú detekciu DNA populácie dravcov pomocou fragmentačnej metódy boli použité mikrosatelitné primery (Nesje M. et al., 2000): NVH fp13 (f: AGC TTG ATT GAG GCT GTG, r: CCA AAT TCC CTG CTG AAG), NVH fp31 (f: ATC ACC TGC ACA TAG CTG, r: TTT AGC TCC TCT CTC TCA C), NVH fp 79-4 (f: TGG CTT CTC TTA TCA GTA AC, r: GGC TGG GTG GAA TTA AAG), NVH fp89 (f: CTC TGC CCT GAA TAC TTA C, r: GAA TCT TGT TTG CAT TGG AG).

Pre mikrosatelitnú detekciu DNA populácie kozy skrutkorohej a adaxa nubijskeho boli použité mikrosatelitné primery (podľa 2001/02 ISAG Comparison Test): HSC, INRA0063, SRCSSP0024, ILST19, INRA0005, MAF0065, SRCRSP0005 a SRCRSP0008 (tabuľka 1).

Tabuľka 1: Použité mikrosatelitné markéry pre kozu skrutkorohú a adaxa nubíjskeho

lokus	primer sekvencia 5' - 3'	veľkosť (bp)
HSC	F: CTG CCA ATG CAG AGA CAC AAG A R: GTC TGT CTC CTG TCT TGT CAT C	22/22
ILST019	F: AGG GAC CTC ATG TAG AAG C R: ACT TTT GGA CCC TGT AGT GC	19/20
INRA0005	F: TTC AGG CAT ACC CTA CAC CAC ATG R: AAA TAT TAG CCA ACT GAA AAC TGG G	24/25
INRA0063	F: GAC CAC AAA GGG ATT TGC ACA AGC R: AAA CCA CAG AAA TGC TTG GAA G	24/22
MAF0065	F: AAA GGC CAG AGT ATG CAA TTA GGA G R: CCA CTC CTC CTG AGA ATA TAA CAT G	25/25
SRCRSP0005	F: GGA CTC TAC CAA CTG AGC TAC AAG R: TGA AAT GAA GCT AAA GCA ATG C	24/22
SRCRSP0008	F: TGC GGT CTG GTT CTG ATT TCA C R: CCT GCA TGA GAA AGT CGA TGC TTA G	22/25
SRCRSP0024	F: AGC AAG AAG TGT CCA CTG ACA G R: TCT AGG TCC ATC TGT GTT ATT GC	22/23

Teplotný a časový režim PCR pre RAPD (94 °C 2 min., 94 °C 1 min., 38 °C 1 min., 72 °C 2 min, 45 cyklov. Teplotný a časový režim PCR pre mikrosatelity: GeneAmp PCR System 9700 cycler (počet cyklov 30): Ramp speed MAX, volume 6, aktivácia: 95°C 10 min, denaturácia: 95°C 30 s, annealing: 55°C 30 s, extenzia: 72°C 1 min, finálna extenzia: 72°C 60 min..

Štiepenie DNA

Pre DNA fingerprinting boli použité reštrikčné endonukleázy: Hinf I (G/ATC), Hae III (GG/CC), Rsa I (GT/AC) a Hbo I (/GATC). V našej práci pre potrebu Southern Blotting boli použité hlavne Hinf I a Hae III.

Hybridizácia podľa Southerna

Základné kroky Southernovej metódy spočívali v separácii DNA fragmentov na ELFO (2,8 % agarózový gél), transfér (prepíjanie) z agarózového gélu na nylonovú membránu, hybridizácia fragmentov DNA s minisatelitnou sondou (alebo sondami), chemiluminiscencia a autorádiografia (RTG snímok), softvérové vyhodnotenie fragmentov. Výsledná minisatelitná sonda 33.6 potom pozostávala z nasledujúcich nukleotidov (celkový počet je 548 bp):

```

1      tacaatgtga gtagaggaga cctcacattt gaccttgaa agttggagga agggctggag
61     gagggctcca gaggaagggc tggaggaagg gctggaggag ggctccagag gaagggctgg
121    aggaagggct ggaggagggc tccggaggaa gggctggagg aagggctgga ggagggctcc
181    ggaggaaggg ctggaggaag ggctggagga gggctccgga ggaagggctg gaggaagggc

```

241 tggaggaggg ctccggagga agggctggag gaagggctgg aggagggtc cggaggaagg
301 gctggaggaa gggctggagg aagggtgga ggagggtcc ggaggaagg ctggaggaag
361 ggctggagga gggctccgga ggaagggtg gaggaagggc tggaggaggg ctccnnnnn
421 nnnnnnggag gaagggtg aggggtc cggaggaagg gctggaggaa gggctggagg
481 agggctccag aggaaggcgg ttgctctca ctctgtggtc tttgtctgc cagacctcc
541 ctcttgg.

Celkový počet jednotlivých báz: A (116), C (83), G (270), T (67) a iné (12)

SÚHRN VÝSLEDKOV A NÁVRH NA VYUŽITIE PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY

Analyzované populácie zvierat z čeľade sokolovité (Falconidae) a turovité (Bovidae) predstavovali pozorovací model, ktorý spĺňal kritéria ohrozenosti druhu a zastupovanie vtákov a cicavcov, ako hodnotiacej vzorky. Testovanie bolo vykonané polymorfnou minisatelitnou sondou 33.6, sadou mikrosatelitných primerov zvlášť pre sokolovité a kozovité a sadou RAPD primerov. Výsledky testovania boli analyzované matematicko-štatistickou metódou zohľadnenú v programe PowerMarker. Pri porovnaní testovaných druhov a jednotlivých exemplárov bola využitá hlavne genetická vzdialenosť na základe priradovania jednotlivých frakcií. Na zohľadnenie všetkých pozorovaných parametrov na úrovni jedincov v rámci druhu a medzidruhových vzťahov boli použité dve metriky zhľukovania, ktoré umožnili komplexné zhodnotenie genetických podobností. Vizualizáciu výsledkov predstavujú dendogramy (podobnostné stromy), ktoré vychádzajú z matice genetických vzdialeností podľa príslušnosti k druhu alebo jednotlivých zvierat a zostrojené metódou Neighbor Joining.

Aplikovaním sondy 33.6 pri sokoloch sme získali fingerprinty s celkovým počtom 37 detekovateľných frakcií. Z celkového počtu v rámci všetkých pozorovaných zvierat a skupín bolo 36 polymorfných. Najväčšia genetická vzdialenosť bola pozorovaná medzi skupinami FTA a FPA - sokol sťahovavý a sokol myšiar.

Rovnaká sonda bola použitá aj pri zástupcoch cicavcov - koza skrutkorohá a adax nubíjsky, kde bolo analyzovaním zistených 42 frakcií, z ktorých bolo 81% polymorfných a použiteľných na určovanie odlišností medzi pozorovanými jedincami.

Fragmentačnou analýzou mikrosatelitných lokusov sokolov boli testované 4 mikrosatelity NVHfp13, NVHfp31, NVHfp79-4 a NVHfp89. Použitím primeru

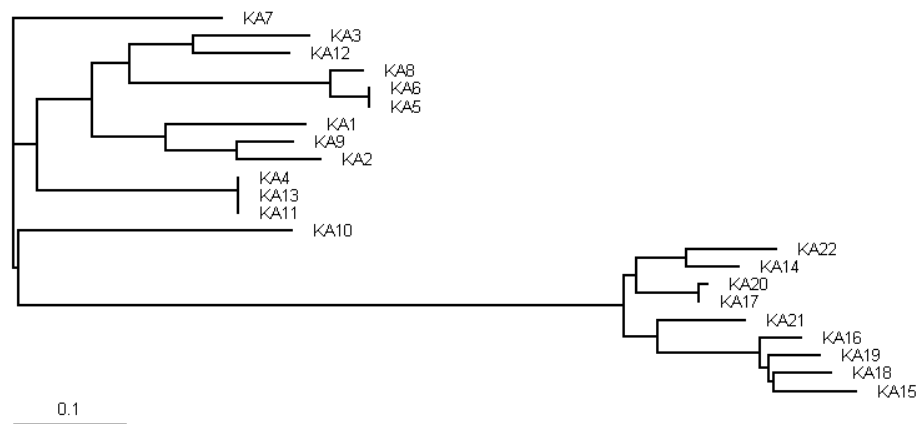
NVHfp13 boli pozorované štyri alely s označením A, C, D a E, najvyššie zastúpenie v sledovanej populácii mala alela C s frekvenciou 0,700. Najnižšie zastúpenie v populácii mala alela E. Primer NVHfp31 vykazoval 10 alel, pričom najväčšie zastúpenie mala alela s označením D a s frekvenciou v populácii 0,425. Najnižšie zastúpenie v populácii mali dve alely C a I, ktoré dosiahli frekvenciu výskytu 0,025. Primer NVHfp79-4 vykazoval 13 alel. Najväčšie zastúpenie mala alela s označením I, ktorá bola pozorovaná 11 krát a dosiahla frekvenciu v populácii 0,275. Alely A, B, C, H a N mali v populácii veľmi malé zastúpenie a vyskytovali sa v najmenšej frekvencii s hodnotou 0,025. Primer NVHfp89 vykazoval 7 alel, najväčšie zastúpenie mala alela s označením B a frekvenciou 0,625. Najmenšie zastúpenie v populácii boli pozorované pri alelách A a D s frekvenciou 0,025. Štatistickými metódami sme posudzovali celkovú schopnosť použitých markérov objektívne posúdiť príbuzenské vzťahy v sledovanej skupine zvierat. Za základné charakteristiky sme použili počet genotypov, počet alel, génovú diverzitu, heterozygotitu, polymorfny informačný obsah a koeficient príbuznosti. V testovacej skupine sokolov bolo vizualizovaných 34 alel, ktoré umožnili vzniknúť 41 rôznym genotypom. Najvyššia génová diverzita bola zachytená použitím mikrosatelitu NVHfp79-4 (tabuľka 2).

Tabuľka 2: Porovnanie génovej diverzity analyzovaných markérov u sokolov

Markér	Počet genotypov	Počet alel	Génová diverzita	Heterozygotita	PIC	F
NVHfp13	5	4	0.4563	0.3000	0.4033	0.3649
NVHfp31	11	10	0.7650	0.5000	0.7435	0.3688
NVHfp79-4	15	13	0.8613	0.8000	0.8486	0.0966
NVHfp89	10	7	0.5750	0.4000	0.5475	0.3274
priemer	10	8	0.6584	0.4963	0.6459	0.2921
štand.chyba			0.0735	0.0921	0.0791	0.0600

Fragmentačnou analýzou mikrosatelitných lokusov pre kozy skutkorohé a adaxa nubíjskeho boli použité mikrosatelitné primeri schválené ISAG pre kozy a to konkrétne osem mikrosatelitných lokusov HSC, INRA0063, SRCRSP0024, ILST19, INRA0005, MAF0065, SRCRSP0005, SRCRSP0008. Lokusy boli overené ako vysoko variabilné v populácii kôz a preto dávali predpoklad zachyteniu odlišností medzi jednotlivými zvieratami v pokusnej skupine spolu s adaxami. Použitím primeru s označením HSC bolo možné pozorovať tri fragmenty, z ktorých najväčšie zastúpenie mal fragment s frekvenciou 0,421 o dĺžke 273 bp. Primer INRA0063 vykazoval štyri fragmenty, ktorých frekvencia sa pohybovala v rozmedzí od 0,068 pri frakcii 176 až po 0,4091

pri frakcii 168. Primer SRCRSP0024 umožnil vznik ôsmich frakcií, najväčšie zastúpenie v populácii sledovaných zvierat mala frakcia 160, ktorá dosiahla frekvenciu výskytu 0,431. Primer ILST19 vykazoval tri frakcie, najvyššie zastúpenie v populácii mala frakcia 150 s frekvenciou 0,700. Primer INRA0005 bol schopný detegovať šesť mikrosatelitných frakcií, z ktorých najčastejšie zastúpenie v populácii mala frakcia 124 a 138 s frekvenciou 0,285. Medzi najmenej zastúpené frakcie patrili frakcia 114 s frekvenciou 0,047. Použitím primeru MAF0065 sa podarilo detegovať tri fragmenty, pričom frekvencia jednotlivých frakcií sa pohybovala v rozmedzí od 0,159 do 0,431. Primer SRCRSP0005 vykazoval štyri frakcie s dĺžkou od 166 bp do 178 bp. Najnižšie zastúpenie v populácii mala frakcia 178. Najvyššie zastúpenie prezentované frekvenciou 0,409 mala frakcia 166. Mikrosatelitným primerom SRCRSP0008 sa podarilo detegovať päť frakcií s dĺžkou od 219 bp po 229 bp. Najväčšie zastúpenie v populácii mala frakcia 225, ktorá sa vyskytovala vo frekvencii 0,611. Celkovo môžeme konštatovať, že bolo získaných 46 genotypov, ktoré vychádzali z celkového počtu 36 alel. Z obrázku 1 vyplýva fakt, že jedince boli na základe matice rozdelené na dva samostatné zhluky, ktoré predstavujú druhové rozdiely medzi *Capra sp.* a *Adax sp.*. Z tohto je možné usúdiť, že metóda detekcie MS je vhodná aj pre stanovenie rozdielov na úrovni druhov, rodov a čeľadí.



Obrázok 1: Dendrogram matice genetických vzdialeností zostavenej medzi jednotlivými exemplármi bez zohľadnenia príslušnosti k skupine (mikrosatelitná detekcia)

Analyzované boli výsledky génovej diverzity, heterozygoty, polymorfného informačného obsahu a koeficientu príbuznosti pre jednotlivé použité mikrosatelity. Aplikovaním mikrosatelitných systémov bolo možné pozorovať, že metóda

fragmentačnej analýzy je schopná detegovať odlišnosti medzi jednotlivými jedincami v teste, rovnako ako aj medzidruhové rozdiely (tabuľka 3).

Tabuľka 3: Porovnanie génovej diverzity analyzovaných markérov u kozy skrutkorohej a adaxa nubíjskeho

Markér	Počet genotypov	Počet alel	Génová diverzita	Heterozygotita	PIC	F
HSC	5	3	0.6330	0.4737	0.5551	0.2768
INRA0063	6	4	0.6911	0.3636	0.6332	0.4917
SRCRSP0024	8	8	0.7149	0.5909	0.6742	0.1959
ILST19	4	3	0.4638	0.4000	0.4175	0.1625
INRA0005	7	6	0.7744	0.6667	0.7390	0.1629
MAF0065	4	3	0.6209	0.2273	0.5405	0.6477
SRCRSP0005	5	4	0.6890	0.2273	0.6307	0.6828
SRCRSP0008	7	5	0.5787	0.5000	0.5417	0.1639
Priemer	5.7	4.5	0.6456	0.4340	0.5940	0.3398

Metóda RAPD bola použitá pre porovnanie ako doplnková metóda, kde sme zaradili do pokusu pre sokoly štyri oligonukleotidové primery la02, 1_/_3, 1_/_5 a la03. S použitím popísaných primerov sa nám v populácii podarilo sledovať celkovo 24 frakcií z ktorých bolo však 7 monomorfných pri všetkých sledovaných zvieratách.

Pre využitie metódy RAPD pre kozu skrutkorohú a adaxa nubíjskeho sme použili osem oligonukleotidových primerov s označením LA02, JA03, JA02, 1_/_3, 1_/_5, W13, F19 a F7. Z celkového počtu 38 pozorovaných frakcií bolo 16 polymorfných, čo predstavuje 42% polymorfných frakcií.

Archivácia a tvorba DNA databázy boli podrobne analyzovaná a do práce bola zakomponovaná konečná verzia uchovávaní všetkých typov dát.

Všeobecne by sme mohli zhrnúť, že chránené druhy zvierat predstavujú väčšinou nízkočetné populácie, kde boli stanovené vhodné metódy založené na detekcii polymorfizmu DNA pomocou nerádioaktívne značených minisatelitných sond a fragmentačná analýza polymorfizmu mikrosatelitov. Najvhodnejšou metódou pre už známe detekovateľné mikrosatelitné markéry jednotlivých druhov je fragmentačná analýza. Túto metódu je však možné použiť v prípade, že sú známe mikrosatelity a je k dispozícii sekvenačná technika. Hlavnú výhodu predstavuje reprodukovateľnosť výsledkov a rutinná laboratórna práca pri optimalizácii jednotlivých krokov. Jej využitie pripadá do úvahy pri populáciách väčšej početnosti. Detekcie VNTR pomocou polymorfných minisatelitných sond je možné aplikovať aj bez materiálne náročnej techniky a je vhodná pre nízkočetné populácie chránených druhov zvierat, kde ešte neboli doposiaľ detekovateľné mikrosatelity. Nevýhodou predstavuje časová náročnosť

na jednotlivé etapy testovania, pracnosť a nízka úroveň reprodukovateľnosti. Metóda RAPD nie je vhodná pre stanovené ciele práce, jej využitie je hlavne pri zisťovaní genetických vzdialeností a hodnotení biodiverzity jednotlivých populácií.

Návrh na využitie poznatkov a záver

Dosiahnuté výsledky v optimalizácii molekulárno-genetických metód a stanovenia DNA profilov pre jednotlivé živočíšne druhy zaradené medzi chránené, je výrazným posunom prepojenia vedy a praktickej ochrany biodiverzity. K jej sekundárnej ochrane môže napomôcť aj tvorba ucelenej DNA databázy o jednotlivých exemplároch chránených druhov zvierat. Stanovené ciele boli nasmerované k optimalizácii najvhodnejších molekulárno-genetických metód pre jednotlivé druhy zvierat z rôzne veľkých populácií, identifikácii exemplárov a tvorby DNA databázy chránených druhov zvierat.

Výber správnej metódy stanovenia DNA profilu pre daný živočíšny druh urýchlí správne a jednoznačné určenie identity jedinca, prípadne potvrdí, resp. vyvráti rodičovstvo. Pri chránených druhoch živočíchov podstata určenia identity a rodičovstva predstavuje základný prvok ich ochrany.

Metóda detekcie polymorfizmu mikrosatelitov je využívaná najmä pri poznaní známych mikrosatelitných sekvencií, ktoré sú špecifické pre daný druh. Metóda je vhodná pre živočíšne druhy rozsiahlych populácií, kde polymorfizmus mikrosatelitov je prevažne použiteľný pre celú čelaď. Potenciál metódy detekcie polymorfizmu minisatelitov sa využíva hlavne pri nízkopopulačných druhoch (menej ako 20 exemplárov), kde nie sú známe a popísané mikrosatelity. Pre stanovenie identity a prípadnej parentity je použiteľných niekoľko polymorfných minisatelitných sekvencií, ako aj nami použitá sonda 33.6. Metóda RAPD je využívaná hlavne na zisťovanie druhovej a medzidruhovej diverzity. Výhodou metódy je jej neviazanosť na špecifickú oblasť DNA, čím dosiahneme väčšiu pestrosť získaných výsledkov genetickej diverzity. Metódu je možno využiť pri celkovom hodnotení genetických vzdialeností uzavretej populácie zvierat a to hlavne pre zostavovanie vhodných párov, resp. samcov pre príparovací proces nepríbuzných (geneticky najvzdialenejších) jedincov.

Potenciál vytvorených prvých ucelených dát, ktoré tvoria základné jednotky pre rozvíjanie komplexnej DNA databázy chránených druhov živočíchov, tvorí základ pre ďalšie väzbu nových druhov zvierat a rozšírenie databázy už existujúcich druhov.

V práci sú charakterizované jednotlivé metódy, detailne rozpracované jednotlivé metodiky a ich modifikácie, vrátane laboratórnych postupov, ktoré môžu slúžiť ako pomôcka pre študentov pri získavaní informácií a poznatkov pre optimalizáciu ich vlastných pokusov.

Vzhľadom k aktuálnosti danej témy boli dosiahnuté výsledky primárnym krokom k prepojeniu monitoringu zvierat ohrozených vyhubením s vednou disciplínou genetika zvierat. Táto práca by mala slúžiť ako štartér pri prepojení ochrany životného prostredia s najmodernejšími poznatkami a vedomosťami vedy na úseku genetiky zvierat. V priebehu realizácie dizertačnej práce sa aj na základe tejto práce implementovali definície DNA profilu a jeho stanovenia do zákonov a ich vykonávacích vyhlášok v SR. V súčasnosti je povinný výkon stanovenia DNA profilu pre vybrané druhy zvierat, ktoré sú primárne ohrozené vyhubením. Týmto smerom sa nám podarilo spojiť využívanie genetiky zvierat v ochrane zložky životného prostredia priamo v praxi. Na základe tejto práce je možné v budúcnosti rozvíjať dané metódy pre ďalšie druhy živočíchov a naplňať tak požadované ciele v širšom uplatnení.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- BRUFORD, M.W. – BURKE, T. 1994. Minisatellite DNA markers in the chicken genome. I. Distribution and abundance of minisatellites in multilocus DNA fingerprints. In: *Anim Genet.*, 1994, 25(6), p. 381-389.
- BURKE, T. – BRUFORD, M.W. 1987. DNA fingerprinting in birds. In: *Nature*, London, 327, 1987, p.149-152.
- DODGSON, J.B. – CHENG, H.H. – OKIMOTO, R.1997. DNA Marker Technology: A Revolution in Animal Genetics. In: *Poultry Science*, vol. 76, 1997, p. 1108–1114
- DOMINGO-ROURA, X. – JACOBSON, H.A. – WEAVER, R.F. 1997. Sex linkage of minisatellite bands in bobcats (*Felis rufus*). In: *J Hered.*, 1997, 88(6), p. 527-31.
- GRIFFITHS, R. – DOUBLE, M.C. – ORR, K. – DAWSON, R.J. 1998. DNA test to sex most birds. In: *Molecular Ecology*, Country of Publication, 1998, 7, ISSN: 0962-1083, p. 1071-1075.
- GRIFFITHS, A.J.F. – MILLER, J.H. – SUZUKI, D.T. 2000. An Introduction to Genetic Analysis. In: New York: W.F. Freeman, 2000.

- GRUNDER, A.A. – SABOUR, M.P. – GAVORA, J.S. 1994. Estimates of relatedness and inbreeding in goose strains from DNA fingerprints. In: *Animal Genetics* 25, supl. 1, 1994, p. 81-88.
- HABERFELD, A. – CAHANER, A. – YOFFE, O. – PLOTSKY, Y. – HILLEL, J. 1991. DNA fingerprints of farm animals generated by microsatellite and minisatellite DNA probes. In: *Animal genetics*, Vo. 22, 1991, p. 299-305.
- HANOTTE, O. – BURKE, T. – ARMOUR, J.A. – JEFFREYS, A.J. 1991. Hypervariable minisatellite DNA sequences in the Indian peafowl *Pavo cristatus*. In: *Genomics* 9, 1991, p. 587-597.
- HRUBAN, V. 1999. Principy a aplikace molekulární genetiky ve šlechtění. In: *Scriptores et auctores rerum: Collegium, ČZU Praha, 1999, ISBN80-213-0519-3.*
- JEFFREYS, A. J. – WILSON, V. – THEYN S. L. 1985a. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. In: *Nature*, Vol. 314, No. 6006, 1985a, p. 67-73.
- JEFFREYS, A.J. – WILSON, V. – THEIN, S.L. 1985b. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. In: *Nature* 316, 1985b, p. 76-79.
- JEFFREYS, A.J. – MORTON, D.B. 1987. DNA fingerprints of dogs and cats. In: *Animal Genetics*, Vol. 18, 1987, p. 1-15.
- JEFFREYS, A.J. – WILSON, V. – NEUMANN, R. – KEYTE, J. 1988. Amplification of human minisatellite by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. In: *Nucleic Acids Research*. Volume 16, No. 23, 1988, p. 10953-10971.
- JEFFREYS, A. J. – MACLOAD, A. – NEUMANN, R. – POVEY, S. – ROYLE, N.J. 1990. „Major minisatellite Loci“ Detected by Minisatellite Clones 33.6 and 33.15 Correspond to the Cognate loci D1S111 and D7S437. In: *Genomics*, 1990, p. 449-452.
- KUHNLEIN, U. – DAWE, Y. – ZADWORNÝ, D. – GAVORA, J.S. 1989. DNA fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry. In: *Theor. Appl. Genet.* 77, 1989, p. 669-672.
- KUHNLEIN, U. – ZADWORNÝ, D. – GAVORA, J.S. – FAIRFULL, R.W. 1991. Identification of Markers Associated with Quantitative Trait Loci in Chicken by DNA fingerprinting. In: *Birkhauser*, 193-293, 1991, p. 274.
- MANNEN, H. – TSUJI, S. – MUKAI, F. – GOTO, N. – OHTAGAKI, S. 1993. Genetic Similarity Using DNA fingerprinting in Cattle to Determinate Relationship Coefficient. In: *Journal of Heredity*, Vol. 84, 1993, p. 166-169.
- MARTÍNEZ-CRUZ, B. – DAVID, A. V. – GODOY, J. A. – NEGRO, J. J. – O'BRIEN, S. J. – JOHNSON, W. E. 2002. Eighteen polymorphic microsatellite markers for the

highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. In: *Molecular Ecology Notes*, 2, 2002, p. 323 – 326.

MAUDET, C. – BEJA-PEREJRA, A. – ZEYL, E. – NAGASH, H. – KENCE, A. – OZUT, D. – BIJU-DUVAL, M. P. – BOOLORMA, S. – COLTMAN, W. – TABERLET, P. – LUIKART, G. 2004. A standart set of polymorphic microsatellites for threatened mountain ungulates (*Caprini*, *Artiodactyla*). In: *Molecular Ecology Notes*, 10, 2004, j.1471-8286, p. 1046.

NESJE, M. – ROED, K.H. 2000. Microsatellite DNA markers from the gyrfalcon (*Falco rusticolus*) and their use in other raptor species. In: *Molecular Ecology*. Blackwell Science Ltd., 2000, 9, p. 1433-1449.

NESJE, M. – ROED, K.H. – LIFJELD, J.T. – LINDBERG, P. – STEENS, O.F. 2000a. Genetic relationship in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markérs. In: *Molecular Ecology*, Vol. 9, 2000a, p. 53-60.

NESJE, M. – ROED, K.H. – BELL, D.A. - LINDBERG, P. – LIFJELD, J.T. 2000b. Microsatellite analysis of population structure and genetic variability in peregrine falcons (*Falco peregrinus*). In: *Animal Conservation*, Vol. 3, Zoological Society of London, 2000b, p. 267-275.

PEREIRA, S.L. – MIYAKI, C.Y. – WAJNTAL, A. 1996. DNA fingerprinting in the rare black-fronted piping guan *Pipile jacutinga* (*Cracidae*, *Aves*). In: *Rev Bras Biol.*, 1996, 56(4), p. 783-91.

RUSSELL, R.J. – FESTING, M.F.W. – DEENY, A.A. – PETERS, A.G. 1993. DNA Fingerprinting for Genetic Monitoring of Inbred laboratory Rats and Mice. In: *Laboratory Animals Science*, Vol. 43, 1993, p. 460-465.

SOUTHERN, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. In: *J. Mol. Biol.* 98, 1975, p. 503-517.

SOUTHERN, E. 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. In: *Methods Enzymol.* 68, 1979, p. 152-176.

VAŠÍČEK, D. 1998. Využitie molekulárno – genetických metód pri včasnej identifikácii dedičných chorôb zvierat. In: *Doktorandská dizertačná práca*, SPU, Nitra, 1998.

WICKINGS, E.J. 1995. Genetic self-management in a captive colony of mandrills (*Mandrillus sphinx*) as revealed by DNA minisatellite fingerprints. In: *Electrophoresis*, 1995, 16(9), p.1678-83.

WILLIAMS, J.G.K. – KUBELIK, A. – LIVAK, K. – RAFALSKI, J.A. – TINGEY, S. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markérs. In: Nucleic Acid Res. 18, 1990, p. 6531-6535.

PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU

Pokorádi, J. - Kulíšek, V. 2000. Protection of endangered animals in Slovak republic. In: Gazdaság és Társadalomtudományi Kar, Tudományos diákköri konferencia előadásainak összefoglalója, 22. november 2000, Gödöllő, Jászberény, p.115.

Pokorádi, J. – Kúbek, A. – Kulíšek, V. – Vašíček, D. 2002. Nezameniteľné označenie chránených druhov živočíchov. In: Zborník referátov z 5. košického morfológického dňa s medzinárodnou účasťou, UVL v Košiciach, 2002, p. 37-38, ISBN 80-88985-66-8.

Pokorádi, J. – Kúbek, A. 2002. Ochrana biodiverzity a nezameniteľné označovanie zvierat v praxi. In: Zborník z medzinárodného vedeckého seminára, „Aktuálne problémy riešené v Agrokomplexe“, SPU 2002, p. 317-320, ISBN 80-8069-126-6.

Pokorádi, J. – Kúbek, A. – Vašíček, D. 2002. Nezameniteľné označovanie chránených druhov zvierat a model duplicity. In: VII międzynarodowa konferencja studenckich kół naukowych, XIX Sejmik SKN, Akademia Rolnicza we Wroclawiu, 2002, p. 46, ISBN 83-87299-86-3.

Pokorádi, J. – Kúbek, A. – Trakovická, A. – Kulíšek, V. – Židek, R. 2002. Ochrana chránených druhov živočíchov a ich nazameniteľné označovanie. In: Zborník abstraktov z Kongresu Slovenských zoológov, Smolenice, 2002, p.5.

Pokorádi, J. – Kúbek, A. – Vašíček, D. 2002. Monitoring genofondu ohrozených druhov živočíchov a využitie DNA analýz. In: Zborník abstraktov z VIII. medzinárodnej vedeckej konferencie študentov a doktorandov, SPU v Nitre, 2002, p. 175-176, ISBN 80-8069-009-X.

Pokorádi, J. – Kúbek, A. – Kulíšek, V. – Tóthová, K. – Židek, R. – Györgyová, S. 2002. Ochrana genofondu ohrozených druhov živočíchov a metódy DNA – Testing. In: Zborník zo Študentskej vedeckej konferencie, PF UK Bratislava, prednáška č. 18, 2002, p. 18.

Pokorádi, J. – Kúbek, A. – Trakovická, A. – Kulíšek, V. – Židek, R. 2003. Ochrana chránených druhov živočíchov a ich nezameniteľné označovanie. Protection of

endangered animals and irreplaceable marks. In: Správy Slovenskej zoologickej spoločnosti, Bratislava, 2003, vol. 20/21, p. 89-92.

Pokorádi, J. – Židek, R. – Rybanská, M. – Bandry, L. 2003. DNA profil chránených druhov živočíchov v praxi. In: Zborník zo IV. vedeckej konferencie doktorandov, UKF Nitra, 2003, p. 58-61, ISBN 80-8050-582-9.

Pokorádi, J. 2003. DNA profil a mikročipizácia chránených druhov živočíchov v praxi. In: Zborník abstraktov z odborného seminára „Spoločne proti vtácej kriminalite“, Bratislava, 2003, s. 13.

Pokorádi, J. – Kúbek, A. 2003. DNA profily zvierat a ich využitie v kriminalistike. In: Zborník abstraktov z IX. medzinárodnej vedeckej konferencie študentov a doktorandov, SPU v Nitre, 2003, p. 118-120, ISBN 80-8069-181-9.

Pokorádi, J. – Židek, R. 2003. Nezameniteľné označovanie chránených druhov živočíchov – DNA testy a ich využitie v chovoch na Slovensku. In: Magazín chovateľa, roč. II, 2003, č. 1, p. 42-43, ISSN 1335-9932.

Vašíček, D. - Pokorádi, J. 2003. Metódy na určenie pohlavia vtákov. In: Magazín chovateľa, roč. II, 2003, č. 6, p. 14-15, ISSN 1335-9932.

Pokorádi, J. – Putnová, L. – Kúbek, A. – Trakovická, A. – Dvořák, J. 2004. Identification of family Falconidae by DNA profile. In: Abstracts of the XXI. Genetic Days. Sessions MG 48 [CD-ROM]. Wroclaw, 2004. ISBN 83-89189-39-9.

Pokorádi, J. 2005. Conservation News Captive Rearing of *Capra falconeri heptneri*. In: Caprinae, Faculty of Agricultural Sciences, University of British Columbia, Vancouver, B.C., Canada, October 2005, p. 4, <http://www.callisto.si.usherb.ca:8080/caprinae/iucnwork.htm>.

Pokorádi, J. – Kulíšek, V. – Haščík, P. – Kúbek, A. 2005. Etické aspekty ochrany a monitoringu chránených druhov živočíchov v SR. In: Slovenský veterinársky časopis, roč. 31, 2005, č. 2, p. 130-131, ISSN 1335-0099.