

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2011

Tereza Matošková

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



Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*)

Bakalářská práce

Tereza Matošková

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 bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho odborné rady, poskytnuté materiály, trpělivost a čas, který mi věnoval během vypracování této bakalářské práce. Poděkování patří taky kolegyním z Laboratoře populační genetiky za jejich pomoc a rady.

SOUHRN

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů, které by mohly být využity pro určování paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*).

Mikrosatelitové lokusy jsem vyhledávala pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace s primery původně navrženými pro řád plameňáci (Phoenicopteriformes), brodiví (Ciconiiformes) a veslonozí (Pelecaniformes). Produkty PCR reakce jsem elektroforeticky separovala a vizualizovala pomocí dusičnanu stříbrného.

Z celkového počtu 78 testovaných párů primerů se mi podařilo najít 35 polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka karibského. U polymorfních mikrosatelitů jsem stanovila počet alel na lokus.

SUMMARY

My bachelor thesis deals with finding of polymorphic microsatellite loci that could be used for paternity determination in the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber*).

To search for microsatellite loci was used method of cross-species PCR amplification with primers originally designed for species belonged to the order Phoenicopteriformes, Ciconiiformes and Pelecaniformes. PCR products were separated by electrophoresis and visualized by silver nitrate.

From the total number of 78 tested microsatellite loci, 35 polymorphic loci were discovered. I found the number of alleles per locus.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	8
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
3.1	Řád plameňáci.....	9
3.1.1	Plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>)	10
3.1.2	Zařazení plameňáka karibského do systému	11
3.2	Repetitivní DNA	12
3.2.1	Satelity	13
3.2.2	Minisatelity	13
3.2.3	Mikrosatelity	14
3.2.3.1	Vznik mikrosatelitů.....	14
3.2.3.2	Izolace mikrosatelitů.....	15
3.2.3.3	Využití mikrosatelitů	15
3.3	Polymerázová řetězová reakce.....	16
3.4	Separace nukleových kyselin pomocí elektroforézy	16
3.5	Problémy při hodnocení PCR produktů.....	17
3.6	<i>Cross-species</i> primery u plameňáka karibského.....	18
4	MATERIÁL A METODIKA	21
4.1	Biologický materiál.....	21
4.2	Vyhledávání vhodných mikrosatelitových markerů pro plameňáka karibského pomocí metody <i>cross-species</i> PCR amplifikace.....	21
4.1.2	PCR amplifikace DNA	22
4.2.2	Zpracování PCR produktů	23
4.3	Použité chemikálie	25
4.4	Použité roztoky	26
4.5	Laboratorní přístroje	27
5	VÝSLEDKY	28
6	DISKUZE	35
7	ZÁVĚR	38
8	SEZNAM ZKRATEK	39
9	POUŽITÁ LITERATURA	40

1 ÚVOD

Mikrosatelity jsou tandemově uspořádané repetice, jejichž jednotka má velikost 1 až 6 párů bází. Vyskytují se v celém genomu jak prokaryot, tak i eukaryot. Mikrosatelity se díky své vysoké variabilitě a početnosti využívají při forenzních analýzách, při určování paternity nebo pro získání informací o genetické struktuře populace. Nevýhodou při práci s mikrosatelity je nutnost izolace *de novo* pro nově studované druhy.

Ve své bakalářské práci se věnuji hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka karibského pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace s primery, které byly navrženy pro řád plameňáci (Phoenicopteriformes), brodiví (Ciconiiformes) a veslonozí (Pelecaniformes).

2 CÍL PRÁCE

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů a vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů s využitím *cross-species* primerů, které jsou známé od taxonomicky příbuzných druhů ptáků a které dosud nebyly u plameňáka karibského testovány.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Řád plameňáci

Řád plameňáci (Phoenicopteriformes) tvoří pouze jedna čeleď: plameňákovití (*Phoenicopteridae*) (Šťastný *et al.*, 1998), která je tvořena třemi rody, a to rodem *Phoenicopterus*, kde del Hoyo *et al.* (1992) zařazují plameňáka růžového (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka chilského (*Phoenicopterus chilensis*). Rod *Phoeniconaias* zahrnuje pouze plameňáka malého (*Phoeniconaias minor*) a do rodu *Phoenicoparrus* jsou zařazeni plameňák andský (*Phoenicoparrus andinus*) a plameňák Jamesův (*Phoenicoparrus jamesi*) (del Hoyo *et al.*, 1992).

Řád plameňáci patří mezi nejstarší známé skupiny ptáků. Fosilní nálezy současných rodů jsou známy už z oligocénu (del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998).

Plameňáci jsou vodní ptáci, pro které je typické malé, oválné tělo s dlouhým krkem a dlouhýma nohama. Nohy nejsou opeřené a mezi prsty je plovací blána umožňující jak plavání, tak chůzi bahnitými mělčinami (Brown *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998). Na malé hlavě je silný zakřivený zobák. Plameňáci pomocí zobáku nasávají směs vody a bahna, která pak prochází lamelovitými filtry na okraji zobáku (Alderton, 1995). Typické je taky zbarvení - bílá a růžová. Růžové zbarvení je podmíněno karotenoidovými pigmenty, které vznikají z mikroskopických řas v potravě činností jaterních enzymů (del Hoyo *et al.*, 1992; Alderton, 1995).

Plameňáci vytváří obrovská hejna, jedná se o vysoce sociální druh. Obývají solná jezera, ústí řek a laguny v místech, kde má voda silně zásadité pH a její teplota může sahat až k 68 °C (Brown *et al.*, 1992). Díky této specializaci na podmínky, které jsou pro většinu organismů nepříznivé, zřejmě mohli plameňáci přežít dlouhé časové období beze změn (del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998). Tito ptáci stavějí hnízda z bahna ve tvaru kužele vysoká asi 30 cm. Potravou pro plameňáky jsou zejména řasy, rozsivky a drobní bezobratlí (Šťastný *et al.*, 1998). Pokud dojde k vyčerpání živin na jednom místě, migruje hejno na nové stanoviště. Plameňáci migrují převážně v noci, přičemž za jednu noc jsou schopni díky letu překonat obrovské vzdálenosti. Rychlost letu se pohybuje v rozmezí 50 až 60 km/h (Brown *et al.*, 1992).

Samice kladou pouze jedno vejce, které zahřívají oba rodiče. Mláďata se líhnou po 27 až 31 dnech. Po narození jsou pokryta hustým šedým prachovým peřím. Ve voleti rodičů se tvoří speciální sekret, kterým jsou mláďata krmena. Produkce tohoto sekretu je řízena hormonálně a spouštěcím mechanismem jsou hlasy mláďat. Tento sekret je zbarven do červena, protože obsahuje mnoho barviv, která jsou ukládána v játrech mláďat a později jsou zodpovědná za tvorbu charakteristického růžového zbarvení (del Hoyo *et al.*, 1992; Alderton, 1995).

Tito ptáci jsou rozšířeni v jižní Evropě, Africe, Jižní a Střední Americe, ve střední a jižní Asii.

Zařazení plameňáků do systému není zcela jasné. Brown *et al.* (1992) uvádějí, že plameňáci díky svým dlouhým nohám a tvaru těla mají blízko k Ciconiiformes. Přítomnost plovacích blán je zase společným znakem s Anseriformes. Charakterizují řád plameňáci jako vysoce specializovaný, který si našel místo mezi Ciconiiformes a Anseriformes. Del Hoyo *et al.* (1992) toto zařazení považují za příliš konzervativní. Na základě výsledků získaných pomocí techniky DNA-DNA hybridizace del Hoyo *et al.* (1992) uvádějí jako jedině příbuzné plameňáků zástupce Ciconiiformes. Podobnosti s Anseriformes nepovažují za příbuzenství, ale za analogické znaky.

3.1.1 Plameňák karibský (*Phoenicopterus ruber*)

Plameňák karibský (viz Obrázek 1 a 2) má nejvýraznější zbarvení ze všech plameňáků. Výška se pohybuje v rozmezí 120 až 140 cm, váha je 2100 až 4100 g. Samičky jsou menší a mají kratší nohy než samci. Tento druh je rozšířen zejména v oblasti Mexika a Karibiku (Anonymous, 2011).

Podle Mezinárodního svazu ochrany přírody (IUCN) patří plameňák karibský mezi méně ohrožené druhy, jelikož celková populace je dostatečně velká a nedosahuje prahových hodnot pro zařazení mezi druhy kriticky ohrožené (prahová hodnota je < 10 000 dospělých jedinců s 10% poklesem populace v průběhu deseti let nebo tří generací) (Anonymous, 2009).

Del Hoyo *et al.* (1992) řadí plameňáka karibského do rodu *Phoenicopterus* společně s plameňákem chilským.

3.1.2 Zařazení plameňáka karibského do systému

- Říše Animalia (živočichové)
- Podříše Eumetazoa (praví mnohobuněční)
- Oddělení Bilateria (trojlistí)
- Kmen Chordata (strunatci)
- Podkmen Vertebrata (obratlovci)
- Nadtřída Tetrapoda (čtyřnožci)
- Třída Aves (ptáci)
- Podtřída Ornithurae (praví ptáci)
- Nadřád Neognathae (letci)
- Řád Phoenicopteriformes (plameňáci)
- Čeleď Phoenicopteridae (plameňákovití)
- Rod *Phoenicopterus* (plameňák)
- Druh *Phoenicopterus ruber* (plameňák karibský)
(Anonymous, 2011)



Obrázek 1: Dospělý jedinec plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) sedící v hnízdě. Zdroj: <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id10501/?taxonid=8422>



Obrázek 2: Dospělý jedinec plameňáka karibského protřepávající si peří. Fotografie byla pořízena v ZOO Praha - Troja.

Zdroj: <http://www.naturephoto.cz/fotobanka/ptaci-birds/2541-plamexnxxak-karibsky-phoenicopterus-ruber.html>

3.2 Repetitivní DNA

Velkou část genomů eukaryot tvoří tak zvaná repetitivní DNA (Snustad *et* Simmons, 2009). Tyto nukleotidové sekvence se v genomu vyskytují v mnoha kopiích. Repetitivní DNA lze rozlišit na tandemově repetitivní DNA a rozptýlenou repetitivní DNA.

Rozptýlená repetitivní DNA neboli transpozony jsou schopny se v rámci genomu přemisťovat, a to procesem zvaným transpozice. Díky této schopnosti jsou transpozony zdrojem plasticity genomu. Rozptýlená repetitivní DNA je tvořena jednotkami o velikosti 100 až 1000 párů bází, které nejsou uspořádány jedna za druhou, ale jsou rozloženy po celém genomu. Celkově se rozptýlená repetitivní DNA podílí na 25 až 40 % genomu savců. Jednotky si jsou podobné, ale nejedná se o identické sekvence (Campbell *et* Reece, 2007). Rozptýlené repetice se dělí na DNA transpozony a

retrotranspozony, které v lidském genomu převažují (Šeda *et al.*, 2005). Mezi nejčastěji se vyskytující retrotranspozony patří dlouhé rozptýlené jaderné elementy (LINEs, *long interspersed nuclear elements*) a krátké rozptýlené jaderné elementy (SINEs, *short interspersed nuclear elements*) (Snustad *et Simmons*, 2009).

Tandemově repetitivní DNA tvoří u savců 10 až 15 % genomu. Jedná se o krátké sekvence o velikosti 1 až 10 párů bází. Tyto malé jednotky jsou opakovány v mnoha sériích. Repetitivní DNA má odlišnou hustotu, čehož lze využít při její izolaci pomocí diferenční ultracentrifugace. Tuto odlišnost repetitivní DNA získala díky rozdílnému nukleotidovému složení od zbytku buněčné DNA (Campbell *et Reece*, 2007). Tandemové repetice dělíme podle velikosti sekvence na satelity, minisatelity a mikrosatelity (Šeda *et al.*, 2005).

3.2.1 Satelity

Satelity jsou tandemové repetice, které se vyskytují v oblasti konstitutivního heterochromatinu, zejména v centromerické oblasti. Satelity patří mezi nejdélejší repetice, mohou být tvořeny jednotkami dlouhými i několik stovek párů bází (Šeda *et al.*, 2005).

3.2.2 Minisatelity

Minisatelity jsou oblasti genomu tvořící tandemově se opakující sekvence. V genomu nejsou rozloženy rovnoměrně, ale jsou lokalizovány na koncích chromozomů (Ramel, 1997). Poprvé byly minisatelity objeveny u člověka, později byly popsány u mnoha dalších organismů, včetně bakterií (Vergnaud *et Denoeud*, 2000). Velikost jednotky repetice se pohybuje v rozmezí 6 až 100 párů bází. Minisatelity jsou oblastmi vykazující vysoký stupeň polymorfismu, liší se počtem opakování, a proto bývají označovány jako VNTRs (*variable number of tandem repeats*). Jelikož jsou minisatelity pro jednotlivce charakteristické, staly se nástrojem při forenzních a genetických analýzách (Ramel, 1997).

3.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity patří mezi polymorfní tandemové repetice a délka jejich opakujících se jednotek je 1 až 6 párů bází (Tóth *et al.*, 2000). Díky své struktuře bývají někdy mikrosatelity označovány jako krátké tandemové repetice (STRs-*short tandem repeats*) nebo repetice jednoduchých sekvencí (SSRs-*simple sequence repeats*) (Zima *et al.*, 2004). Mikrosatelity jsou součástí genomu prokaryot i eukaryot a v genomu se nacházejí jak v kódujících, tak i nekódujících oblastech (Zane *et al.*, 2002). Pro mikrosatelity je charakteristická vysoká mutační rychlost. Na evoluci mikrosatelitů se podílí celá řada mutačních mechanismů, ale hlavním zdrojem proměnlivosti je sklouznutí nukleotidového řetězce během replikace. Díky své vysoké mutabilitě jsou základem pro evoluci genomu (Tóth *et al.*, 2000; Zima *et al.*, 2004; Šeda *et al.*, 2005). Podle délky repetice se mikrosatelity dělí na dinukleotidové, tri- a tetranukleotidové. Nejčastějšími trinukleotidy jsou AAT a CAG. Mezi výhody mikrosatelitů patří vysoká proměnlivost, početnost v genomu a jednoduchá analýza (Zima *et al.*, 2004). Nevýhodou mikrosatelitů je potřeba izolace *de novo* při studiu nových druhů (Zane *et al.*, 2002). Pokud se mikrosatelity nacházejí uvnitř anebo v blízkosti genů, mohou se rozvíjet onemocnění vyvolaná zvýšeným počtem trinukleotidových repetic. Mezi taková onemocnění patří Huntingtonova choroba nebo svalová dystrofie (Šeda *et al.*, 2005).

3.2.3.1 Vznik mikrosatelitů

Podle způsobu vzniku můžeme rozlišit dva typy mikrosatelitů. První typ jsou tzv. *de novo* mikrosatelity, které vznikají z protomikrosatelitů, což jsou krátké repetice tvořené třemi nebo čtyřmi opakujícími se jednotkami. Druhým typem jsou adaptované mikrosatelity, které vznikají přenosem z jiného místa genomu prostřednictvím transpozonu. Konkrétně se jedná zejména o SINE a LINE, které obsahují jedno či více míst vhodných pro vznik mikrosatelitů (Buschiazzo *et Gemmel*, 2006).

3.2.3.2 Izolace mikrosatelitů

V současné době existuje celá řada technik pro izolaci mikrosatelitů. Dříve byly mikrosatelity izolovány z genomových knihoven studovaných druhů. Byl proveden screening několika tisíc klonů za pomoci hybridizace se sondou. Tento přístup však nebyl příliš vhodný pro druhy s nízkou frekvencí výskytu mikrosatelitů, a proto byla snaha vyvinout techniky, které by nebyly časově náročné a zároveň by zvyšovaly výtěžek reakce. Byly navrženy změny v náhodné amplifikaci polymorfní DNA za využití náhodných primerů, RAPD primerů a membránové hybridizace se sondami. Ačkoli tyto techniky jsou úspěšné, nejsou příliš využívány (Zane *et al.*, 2002). Mikrosatelity mohou být izolovány pomocí selektivní hybridizace. Nejdříve se provede fragmentace DNA pomocí restričních enzymů či ultrazvuku a získané DNA fragmenty jsou navázány na vektor či adaptor. Navázání na vektor umožňuje amplifikaci pomocí PCR. Následuje selektivní hybridizace pomocí sond, které obsahují repetice vyhledávaného motivu (Zima *et al.*, 2004). Další skupina technik je založena na prodlužování primerů. Nejdříve je genomová DNA rozštípana na fragmenty, které jsou pak vloženy do bakteriofága. Tímto způsobem získaná ssDNA je využita jako templát při prodlužování primerů. Při reakci se využívají speciální primery, které tvoří dvouvláknové produkty pouze z oblastí zahrnujících požadovanou repetici (Zane *et al.*, 2002). Využívanou technikou pro izolaci mikrosatelitů je FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences COntaining repeats). Jedná se o techniku jednoduchou, zbavenou o postradatelné kroky. Postup byl testován na různých organismech jako ptáci (*Passera lagia*), ryby (*Sparus aurata*, *Lophius americanus*), korýši (*Meganyctiphanes norvegica*) a červené korály (*Corallium rubrum*) (Zane *et al.*, 2002).

3.2.3.3 Využití mikrosatelitů

V posledním desetiletí se mikrosatelity začaly díky své vysoké variabilitě a početnosti využívat jako molekulární markery při forenzních analýzách, při určování paternity, velikosti populace či genetické proměnlivosti. Specifické mikrosatelity usnadňují identifikaci populací a druhů. Mikrosatelitové lokusy rozmístěné podél chromozomu umožňují identifikovat oblasti genomu, na které působí přírodní výběr a

mohou zde taky sloužit jako bariéry toku genů v počátečních fázích speciace (Zane *et al.*, 2002; Zima *et al.*, 2004; Primmer *et al.*, 2005).

3.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je technika, která umožňuje enzymatickou syntézu nových vláken vybraných úseků dsDNA *in vitro* (Šmarda *et al.*, 2005). Vybrané sekvence, které mají být namnoženy, musejí být ohraničeny pomocí primerů. Ty se na templátovou DNA váží tak, aby jejich 3'-konce směřovaly proti sobě. Nová vlákna DNA jsou syntetizována pomocí termostabilní polymerázy (např. *Taq* DNA polymeráza) (Alberts *et al.*, 2005; Šmarda *et al.*, 2005).

Mezi základní složky PCR směsi patří templátová DNA, dva oligonukleotidové primery, čtyři deoxyribonukleosidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), DNA polymeráza, pufr a hořčnaté kationty. Objem PCR směsi je doplněn deionizovanou vodou.

PCR probíhá ve třech krocích, které se cyklicky opakují. Obvykle k dostatečné amplifikaci DNA postačí 20 až 40 cyklů. V prvním kroku dochází při 92-95 °C k denuraci dsDNA, následuje snížení teploty na 46-60 °C a nasednutí primerů na oddělené řetězce DNA. V posledním kroku probíhá syntéza nových vláken DNA od 5'-konce k 3'-konci, která je katalyzována DNA polymerázou. Teplota, při které k syntéze dochází, je závislá na typu DNA polymerázy. Optimální teplota pro *Taq* DNA polymerázu se pohybuje v rozpětí 70-75 °C (Zima *et al.*, 2004; Alberts *et al.*, 2005).

PCR reakce probíhá v zařízení zvaném termocyklér, kde dochází k automatickým změnám teploty v závislosti na tom, jaký krok zrovna probíhá. Opakování cyklů umožňuje získat mnohonásobně zmnožených úseků DNA (Šmarda *et al.*, 2005).

3.4 Separace nukleových kyselin pomocí elektroforézy

V molekulární biologii patří elektroforéza k nejpoužívanějším metodám při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin (Šmarda *et al.*, 2005). Elektroforetická separace je založena na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Směr a rychlost

pohybu molekul v poli je závislá na jejich náboji a velikosti (Alberts *et al.*, 2005). Nukleové kyseliny mají záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybují od katody k anodě. Při elektroforéze se jako nosič nejčastěji využívá polyakrylamidový nebo agarózový gel (Brown, 2007). Podle umístění gelu v elektroforetické komůrce lze rozlišit elektroforézu horizontální a vertikální. Pokud se gel nachází v kapiláře, jedná se o kapilární elektroforézu (Šmarda *et al.*, 2005).

Při elektroforéze v polyakrylamidovém gelu (PAGE) dochází k separaci molekul na základě jejich náboje a velikosti. Polyakrylamidový gel vzniká reakcí akrylamidu a N, N'-metylen bisakrylamidu. Koncentrace těchto dvou složek určuje velikost pórů v gelu (Zima *et al.*, 2004).

Po ukončení elektroforetické separace je potřeba polohu molekul vizualizovat. Pro zviditelnění molekul DNA se často využívá etidiumbromid a další fluorescenční barviva. Pro identifikaci molekul DNA separovaných v polyakrylamidovém gelu se používá dusičnan stříbrný (Šmarda *et al.*, 2005; Brown, 2007).

3.5 Problémy při hodnocení PCR produktů

Hodnocení PCR produktů může být zkomplikováno přítomností zejména stutter bandů, nulových alel a homoplazií alel.

Stutter bandy

Při analýzy mikrosatelitů jsou PCR produkty separovány pomocí gelové nebo kapilární elektroforézy a alely jsou vizualizované v podobě bandů. Pokud je hlavní band alely doprovázen přítomností jedné či více kopií, jedná se o takzvané stutter bandy (Walsh *et al.*, 1996). Stutter bandy vznikají sklouznutím DNA polymerázy během replikace templátové DNA. Tyto bandy jsou obvykle o dvě báze kratší než hlavní band alely (Walsh *et al.*, 1996). Výskyt stutter bandů je nejčastější u dinukleotidových repetit, méně častý je pak u tri- a tetranukleotidových repetit (Miller *et Yuan*, 1997).

Stutter bandy při hodnocení znemožňují identifikaci heterozygotních jedinců, jelikož vytvářejí jeden souvislý band, což může vést k chybnému označení jedince za homozygota (Miller *et Yuan*, 1997). Eliminovat tvorbu stutter bandů lze s využitím DNA polymerázy s vysokou procesivitou, optimalizací podmínek PCR anebo použitím odlišných primerů (Walsh *et al.*, 1996; Miller *et Yuan*, 1997).

Nulové alely

Za nulové alely jsou označeny všechny alely, které se během PCR neamplifikují (Dakin *et* Avise, 2004). Výskyt nulových alel byl pozorován u mnoha organismů, a to jak u rostlin, tak i u živočichů (Chybili *et* Burczyk, 2009). Za tvorbu nulových alel jsou zodpovědné mutace vzniklé v místech nasedání primerů při PCR. Za další příčinu vzniku těchto alel bývá považována rozdílná amplifikace různě dlouhých alel. Krátké alely se amplifikují efektivněji než alely dlouhé. Díky této rozdílnosti v amplifikaci může dojít k tomu, že u heterozygotního jedince bude detekována pouze alela kratší. Tento problém lze snadno odstranit zvýšením množství templátové DNA nebo upravením kontrastu (Dakin *et* Avise, 2004).

Nulové alely zvyšují v populaci poměr homozygotů, což vede k problémům při paternitních studiích, jelikož může dojít k chybnému vyloučení otcovství. Heterozygotní otec nesoucí nulovou alelu se totiž při hodnocení PCR produktů jeví jako homozygot (Jones *et* Ardren, 2003; Walsh *et* Avise, 2004).

Homoplazie alel

Homoplazie alel je stav, kdy alely lokusu jsou shodné v délce, ale nejsou identické původem. Za tvorbu homoplazie alel jsou zodpovědné mutace, při kterých dochází ke vzniku nových alel (Estoup *et al.*, 2002).

Homoplazické alely lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří alely, které mají shodnou délku, ale liší se sekvencemi. Tyto alely lze pomocí sekvenování odhalit. Druhou skupinou jsou alely shodné jak v délce, tak i v sekvenci, ale neidentické původem. Tuto skupinu homoplazických alel lze detekovat pouze pomocí již zdokumentovaných mutací (Anmarkrud *et al.*, 2008).

Homoplazie alel nepředstavuje u většiny populačně genetických analýz významný problém, jelikož je kompenzována vysokou variabilitou mikrosatelitových lokusů (Estoup *et al.*, 2002).

3.6 Cross-species primery u plameňáka karibského

Mikrosatelity jsou stále více využívány při populačních studiích. U ptáků byla *cross-species* PCR amplifikace poprvé provedena pomocí sady primerů, které byly izolovány z DNA vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) a lejska černohlavého (*Ficedula*

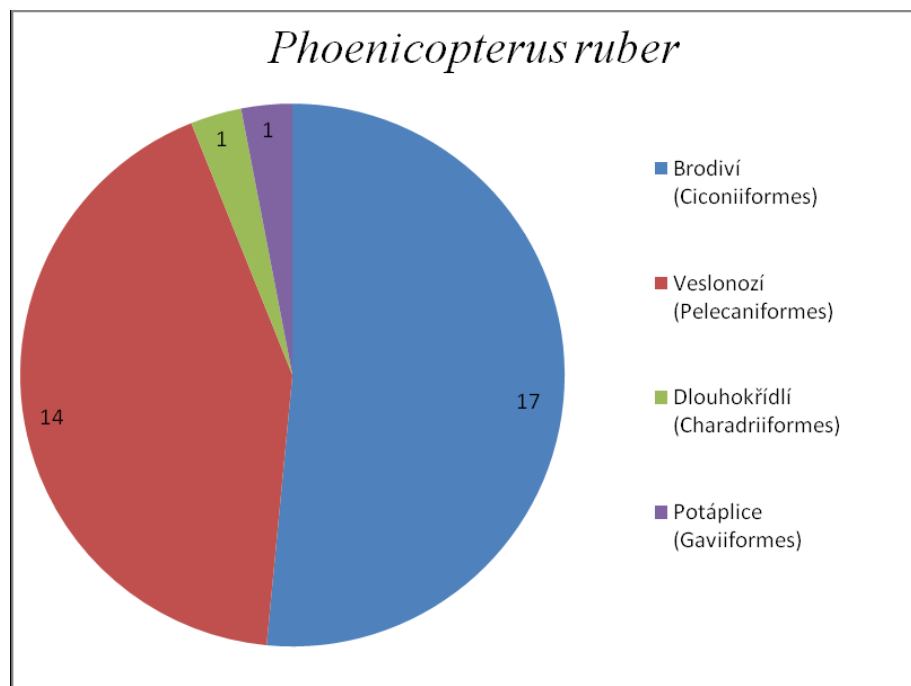
hypoleuca). Tyto primery byly testovány na 48 různých druzích ptáků. Bylo zjištěno, že se zvyšující se fylogenetickou vzdáleností mezi zdrojovým a testovaným druhem dochází k poklesu počtu amplifikovaných polymorfních markerů (Primmer *et al.*, 1996).

Nevýhodou při *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů je fakt, že primery nejsou univerzální. Nelze je tedy využít u mnoha různých druhů, jelikož úspěšnost amplifikace závisí na fylogenetické rozdílnosti druhu testovaného a druhu, pro který byly primery primárně navrženy (Primmer *et al.*, 2005).

Studiem polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka karibského se již zabývali Kapil *et al.* (2010), kterým se podařilo izolovat 9 mikrosatelitových lokusů Pru μ 1 až Pru μ 9 z genomické knihovny plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Počet alel na lokus byl v rozmezí 3 až 14. Geraci *et al.* (2010) charakterizovali 37 polymorfních mikrosatelitových lokusů pro plameňáka růžového. Průměrný počet alel na lokus byl 7,32. Hledáním polymorfních mikrosatelitů u plameňáka karibského se ve své diplomové práci zabýval také Drobek (2010). K hledání mikrosatelitů využil techniku *cross-species* PCR amplifikace a s pomocí celkem 214 párů primerů navržených pro druhy z řádu brodiví, veslonozí, dlouhokřídlí a potáplice se mu podařilo u plameňáka karibského objevit 33 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Zastoupení polymorfních mikrosatelitů z jednotlivých řádů znázorňuje Graf 1.

Graf 1: Zastoupení objevených polymorfních mikrosatelitů z jednotlivých řádů u plameňáka karibského. Zdroj: Diplomová práce (Drobek, 2010)



Drobek (2010) zaznamenal nejúspěšnější amplifikaci polymorfních lokusů u plameňáka karibského s využitím primerů navržených pro řád brodiví. Testováním 18 párů primerů odvozených od volavky žlutozobé našel autor 4 polymorfní mikrosatelity. Analýzou 34 párů primerů získaných z DNA ibise rudého a ibise čínského se Drobkovi (2010) podařilo objevit 7 polymorfních lokusů. Testováním 23 mikrosatelitových lokusů odvozených od kolpíka malého a 15 lokusů nesyta lesního autor objevil u plameňáka karibského čtyři polymorfní lokusy. Pouze jeden polymorfní lokus se podařilo najít testováním 17 párů primerů izolovaných z DNA volavky velké. Pro čápa bílého bylo navrženo 13 polymorfních lokusů, z nich pouze jeden je polymorfní i u plameňáka karibského.

Druhou skupinou testovaných mikrosatelitových lokusů tvoří mikrosatelity navržené pro druhy z řádu veslonozí. Drobek (2010) testoval 41 párů primerů ze skupiny tří terejů, tereje modronohého, tereje červenonohého a tereje guanového. Z tohoto počtu byly u plameňáka karibského polymorfní pouze 4 mikrosatelity. Velkou skupinu testovaných mikrosatelitů tvoří lokusy odvozené od kormorána velkého, kormorána ušatého a kormorána galapážského. Z 39 testovaných párů primerů amplifikovaly pouze 3 páry polymorfní mikrosatelity u plameňáka karibského. Z pelikána severoamerického a pelikána bílého bylo izolováno celkem 19 mikrosatelitů, z nich pouze 3 amplifikovaly polymorfní lokusy. Pět polymorfních mikrosatelitů Drobek (2010) našel testováním 18 mikrosatelitů odvozených od fregatky obecné.

Drobek (2010) testoval dva vybrané mikrosatelity Apy 06 a Apy 07 alkounka drobného z řádu dlouhokřídlí. Jeden lokus vykazoval polymorfismus i u plameňáka karibského.

Pouze jeden polymorfní lokus se podařilo nalézt Drobkovi (2010) analýzou 7 párů primerů navržených pro potáplici lední, zástupce řádu potáplice.

Do skupiny neúspěšných cross-species druhů Drobek (2010) zařadil kvakoše nočního z řádu brodiví s jeho 11 mikrosatelity. Neúspěšná byla taky amplifikace pomocí primerů odvozených od zástupců řádu vrubozobí, a to kachny divoké, kachnice laločnaté, pižmovky velké a kajky mořské.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

Biologický materiál byl získán ze ZOO Dvůr Králové. Vzorky krve byly jedincům pocházejícím z přírody odebrány z křídla nebo tarzální žíly a poté uchovávány v Queen's pufu. Z krve byla DNA izolována fenolchloroformovou cestou a naředěna na koncentraci 10-50 mg/ml. Takto připravená DNA byla použita pro PCR.

4.2 Vyhledávání vhodných mikrosatelitových markerů pro plameňáka karibského pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace

Pro hledání vhodných markerů pro plameňáka karibského pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace bylo využito párů primerů, které amplifikovaly polymorfní mikrosatelity u zástupců z řádů brodiví (Ciconiiformes), veslonozí (Pelecaniformes) a plameňáci (Phoenicopteriformes).

Přehled všech testovaných mikrosatelitových lokusů společně se zdrojovým druhem a autory, kteří tyto lokusy publikovali, jsou uvedeni v Tabulce 1.

Tabulka 1: Testované mikrosatelitové lokusy u plameňáka karibského (*Phoenicopus ruber*). V tabulce jsou uvedeny zdrojové druhy, jejich zařazení do řádů, jednotlivé mikrosatelitové lokusy a jejich autoři.

Řád	Zdrojový druh	Testované mikrosatelitové lokusy	Autor, rok publikace
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák růžový (<i>Phoenicopus roseus</i>)	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139	Geraci <i>et al.</i> , 2010

Tabulka 1: Pokračování.

Řád	Zdrojový druh	Testované mikrosatelitové lokusy	Autor, rok publikace
Brodiví (Ciconiiformes)	Volovka červenavá (<i>Egretta rufescens</i>)	Er21, Er22, Er23, Er24, Er31, Er41, Er42, Er43, Er44, Er45, Er46, Er51	Hill <i>et al.</i> , 2010
Veslonoží (Pelecaniformes)	Kormorán ušatý (<i>Phalacrocorax auritus</i>)	Dcco-01, Dcco-02, Dcco-03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08	Mercer <i>et al.</i> , 2010
	Kormorán chocholatý (<i>Phalacrocorax aristotelis</i>)	Phaari01, Phaari02, Phaari03, Phaari05, Phaari06, Phaari08, Phaari11, Phaari12, Phaari14, Phaari16	Barlow <i>et al.</i> , 2011
	Faeton žlutozobý (<i>Phaethon lepturus</i>)	P3A3, P3A4, P3C1, P3D7, P3F3, P3F5, P3F7, P3G12, P3H10, P4F2, P4G1	Humeau, 2011

4.1.2 PCR amplifikace DNA

Jednotlivé složky PCR reakční směsi uvedené níže byly napipetovány do mikrozkušavky, poté zvortexovány a centrifugovány. Tato směs byla rozpipetována po 9 µl do mikrozkušavek s 1 µl roztoku DNA.

Složení PCR reakční směsi pro 6 vzorků včetně zahrnutých ztrát při pipetování:

deionizovaná voda	41,90 µl
reakční pufr (10x)	6,70 µl
roztok MgCl ₂ (25mmol/l)	3,75 µl
roztok dNTPs (25 nmol/l)	0,65 µl
primer F (10 µmol/l)	3,10 µl
primer R (10 µmol/l)	3,10 µl
Taq DNA polymeráza (5 U/µl)	1,00 µl

Vzorky byly umístěny do termocykléru s následujícím časovým a teplotním profilem polymerázové řetězové reakce.

5 min:	94 °C	} 35 cyklů
30 s:	94 °C	
30 s:	50 °C, 55 °C	
30 s:	72 °C	
7 min:	72 °C	

4.2.2 Zpracování PCR produktů

Následující postup byl optimalizován pro použití vyhřívané sekvenční elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

Příprava 6% polyakrylamidového gelu

- 1) Velké sklo bylo omyto pomocí kartáčku deionizovanou vodou, osušeno a plocha, která se dotýká gelu, byla ošetřena přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů. Přípravek bylo nutné nechat 5 minut působit a poté bylo sklo opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno.
- 2) Malé sklo bylo omyto pomocí kartáčku a saponátu, opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno. Plocha, která se dotýká gelu, byla ošetřena roztokem 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Po 5 minutách byla plocha opláchnuta 96% ethanolem a osušena.
- 3) Na větší sklo byly po stranách položeny 0,4 mm silné spacers a na ně bylo položeno menší sklo. Skla byla poskládána tak, aby ošetřené plochy byly uvnitř. Na jedné straně byly hrany skel těsně v zákrytu a na protilehlé straně byly konce skel vzájemně posunuty přibližně o 2,5 cm. V místě spacerů byla skla na každé straně sepnuta dvěma klipsy.
- 4) Gel byl připraven v kádince smícháním všech složek (viz Použité roztoky). Roztok byl promíchán a poté nalit mezi skla. Během nalívání gelu bylo nutné na sklo poklepávat, aby se předešlo vzniku bublin v gelu. Po vyplnění celého prostoru mezi skly byl mezi skla vsunut hřebínek jeho rovnou stranou asi 0,7 až 1 cm hluboko. Skla byla v místě hřebínku sepnuta čtyřmi klipsy a gel se nechal hodinu polymerizovat.

Elektroforetická separace PCR produktů

- 1) Po utužení gelu byla skla důkladně omyta od všech zbytků polyakrylamidu, osušena a upevněna pomocí šroubovacích úchytů do elektroforetické komůrky tak, aby se kratší sklo dotýkalo hliníkové desky elektroforetické komůrky. Elektrodové prostory byly zality 0,5 x TBE puřem, uzavřeny a byly nasazeny elektrody. Zdroj stejnosměrného elektrického proudu byl nastaven na hodnotu

90 W (hodnoty elektrického napětí a proudu na maximální hodnoty: 3000 V/150 mA). Za těchto podmínek byl gel nahříván asi 30 minut.

- 2) Během nahřívání gelu byly PCR produkty smíchány s nanášecím pufrům v poměru 2:1 a nechaly se denaturovat v termocykléru po dobu 3 minut. Aby se zabránilo zpětné renaturaci, byly vzorky po vytažení vloženy do ledové tříště.
- 3) Během denaturace byl vypnut zdroj stejnosměrného proudu, katoda byla odpojena a katodový prostor otevřen. Mezera mezi skly byla očištěna proudem pufru z injekční stříkačky od zbytků polyakrylamidu. Do mezery byl vsunut hřebínek zoubky asi 1mm hluboko do gelu.
- 4) Do mezer mezi zoubky byly naneseny vzorky po 2 μ l. Po napipetování všech vzorků byl katodový prostor uzavřen, byla nasazena elektroda a na zdroji stejnosměrného proudu byla nastavena hodnota 70 W (hodnoty elektrického napětí a proudu zůstaly nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA). Čas separace PCR produktů byl optimalizován tak, aby bylo možné u polymorfních produktů rozlišit jednotlivé alely. Obvyklá doba separace byla 90 minut.

Vizualizace elektroforetogramu

- 1) Během elektroforetické separace byly připraveny roztoky pro vymývání gelu a následnou vizualizaci separovaných PCR produktů (viz Použité roztoky).
- 2) Po uplynutí času elektroforetického dělení vzorků byl zdroj stejnosměrného elektrického proudu vypnut, elektrody byly odpojeny a pufr byl vypuštěn z katodového prostoru. Skla byla vyjmuta z elektroforetické komůrky, z prostoru mezi skly byl opatrně vytažen hřebínek i spacers a skla byla od sebe oddělena.
- 3) Menší sklo bylo gelem nahoru umístěno do fotomisky na třepačce a zalito fix/stop roztokem. Doba působení fix/stop roztoku je asi 20 minut. Po této době byl roztok slit zpět do baňky a sklo s gelem bylo promyto 3x v deionizované vodě.
- 4) Sklo bylo znovu vloženo na třepačku a promýváno 5 minut v 1% roztoku HNO_3 . Poté bylo sklo promyto 4 krát deionizovanou vodou.
- 5) Sklo s gelem bylo umístěno na třepačku do 0,1% roztoku AgNO_3 . Roztok působí 30 minut. Po uplynutí této doby byl roztok slit zpět do zásobní láhve. Sklo s gelem bylo na 5 vteřin ponořeno do deionizované vody a poté přemístěno do fotomisky na třepačce. Gel byl zalit vývojkou a bylo sledováno vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů.

- 6) Ve chvíli, kdy byly proužky dostatečně zřetelné, bylo vyvíjení zastaveno přilitím fix/stop roztoku uchovaného z kroku 3. Sklo s gelem pak bylo ponořeno na 2 minuty do deionizované vody a poté přeneseno do sušárny, kde se gel sušil 1 hodinu při teplotě 60 °C.
- 7) Po vysušení bylo sklo označeno, vyhodnoceno na negatoskopu a naskenováno pro uchování elektroforetogramu.
- 8) Sklo s nepotřebným gelem bylo ponořeno do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l na několik desítek minut až několik hodin. Gel se v roztoku odlepí. Sklo bylo omyto a připraveno k dalšímu použití.

4.3 Použité chemikálie

- Akrylamid (Serva)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400 μl každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol - 96% roztok (liho var Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová - ledová (Lachema)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)
- N,N'-metylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Clear Vue, Rain Repellent (Turtle WAX)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.4 Použité roztoky

- **Fix/stop roztok:**
800 ml deionizované vody
88 ml ledové kyseliny octové
- **Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:**
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
40 μ l N, N, N', N'-tetramethylethyldiaminu
400 μ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- **Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného AgNO_3 :**
0,8 g AgNO_3
objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml
před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu
- **Roztok hydroxidu sodného NaOH 1 mol/l:**
40 g hydroxidu sodného
rozpustit v 800 ml deionizované vody
doplnit deionizovanou vodou na 1 l
- **Roztok 1% kyseliny dusičné HNO_3 :**
800 ml deionizované vody
12 ml 65% HNO_3
- **Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:**
1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu
- **Roztok 10% peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$:**
1 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
rozpustit v 10 ml deionizované vody
uchovávat v chladničce
- **Vývojka:**
800 ml deionizované vody
24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3
umístit do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než 10 °C
před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l 1% roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

- **Zásobní roztok 6% akrylamidu:**
420 g močoviny
484 ml deionizované vody
50 ml 10 x TBE
150 ml zásobního 40% roztoku akrylamid : N, N'- methylenbisakrylamid 19:1
po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné lahvi ve 4 °C
- **Zásobní roztok 10x TBE pufri:**
108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
55 g kyseliny borité H₃BO₃
40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
rozpusťit v 800 ml deionizované vody, doplnit deionizovanou vodou na 1 l

4.5 Laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)
- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy MARKS 622 Electronic (Bel Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette 0,5 až 10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific Ltd)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenční elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna HS 122S (Chirana)
- Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Techne)
- Termocyklér Gene-Pro (Bioer technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér XP Thermal Cyclor (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)

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo nalezení polymorfních mikrosatelitových lokusů, které by umožnily determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). K hledání polymorfních lokusů byla využita metoda *cross-species* PCR amplifikace s primery původně navrženými pro řád plameňáci (Phoenicopteriformes), brodiví (Ciconiiformes) a veslonozí (Pelecaniformes). Při testování byla využita DNA 6 jedinců plameňáka karibského, která byla izolována z krevních vzorků získaných ze ZOO Dvůr Králové.

Analýzou 78 párů primerů se podařilo najít u plameňáka karibského 35 polymorfních mikrosatelitových lokusů, z toho 31 lokusů bylo amplifikováno pomocí primerů odvozených od plameňáka růžového. S využitím mikrosatelitů navržených pro faetona žlutozobého byly objeveny dva polymorfní lokusy. Jeden mikrosatelitový lokus byl amplifikován primery izolovanými z kormorána ušatého a pomocí mikrosatelitů odvozených od volavky červenavé byl objeven také jeden polymorfní lokus. Počet alel na lokus se pohyboval v rozmezí 2 až 9 alel.

8 SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
AFLP	polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dATP	deoxyriboadenosintrifosfát
dCTP	deoxyribocytidintrifosfát
dGTP	deoxyriboguanosintrifosfát
dsDNA	dvouvláknová DNA (<i>double stranded DNA</i>)
dTTP	deoxyribothymidintrifosfát
FIASCO	metoda izolace mikrosatelitových markerů (<i>Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats</i>)
G	guanin
IUCN	Mezinárodní svaz ochrany přírody a přírodních zdrojů (<i>International Union for Conservation of Nature and Natural Resources</i>)
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné elementy (<i>long interspersed nuclear elements</i>)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RAPD	náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
SINEs	krátké rozptýlené jaderné elementy (<i>short interspersed nuclear elements</i>)
ssDNA	jednovláknová DNA (<i>single stranded DNA</i>)
SSRs	označení mikrosatelitů (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
STRs	označení mikrosatelitů (<i>Short tandem repeats</i>)
T	tymin
T _a	<i>annealing</i> teplota PCR reakce (<i>Annealing temperature</i>)
U	uracil
VNTRs	označení minisatelitů (<i>Variable number of tandem repeats</i>)

9 POUŽITÁ LITERATURA

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2005): Základy buněčné biologie. Espero Publishing, Ústí nad Labem.

Alderton, D. (1995): Ptáci. Nakladatelský dům OP s.r.o., Praha

Anmarkrud J.A., Kleven O., Bachmann L., Lifjeld J.T. (2008): Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evolutionary Biology* 8, 138-148.

Anonymous (2011): Zařazení v systému. Publikováno online www.biolib.cz, navštíveno 5. 7. 2011.

Anonymous (2009): BirdLife International 2009. *Phoenicopterus ruber*. In: IUNC 2011. IUNC Red List of Threatened Species. Publikováno online www.iucnredlist.org, navštíveno 5. 7. 2011.

Barlow, E.J., Telford, A., Daunt, F., Cavers, S. (2011): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag. *Molecular Ecology Resources*. Preprint.

Brown, L.H., Urban, E.K., Newman, K. (1992): The Birds of Africa, Volume I. Academic Press, London.

Brown, T.A. (2007): Klonování genů a analýza DNA. Úvod. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

Buschiazzo E., Gemmel N.J. (2006): The rise, fall and the renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssay* 28, 1040-1050.

Campbell, N.A., Reece, J.B. (2007): Biologie. Computer Press, Brno.

Dakin E.E., Avise J.C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504-509.

Drobek, A. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Estoup A., Jarne P., Cornuet J.-M. (2002): Homoplasies and mutations model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.

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.

Hill, A., Green, M.C. (2010): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources*. Preprint.

Horáková, I. (2010): Analýza polymorfních *cross-species* mikroatelitů pro determinaci paternity u ibise hagedaše (*Bostrychia hagedash*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

del Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J. (1992): Handbook of the birds of the world. Vol. 1. Lynx Edicions, Barcelona.

Humeau, L., Da Silva, D., Guérin, F., Jaquemet, S., Requier, J.-B., Le Corre, M. (2011) : Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Phaethon lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources*. Preprint

Chybicki I.J., Burczyk J. (2009): Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity* 100, 106-113.

Jones A.G., Ardren W.R. (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12, 2511-2523.

Kapil, R., Sawyer, G.M., Preston, L., Benjamin, R.C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamenco (*Phoenicopterus ruber ruber*). Preprint.

Mercer, D.M., Haig, S.M., Mullit, T.D. (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources*. Preprint.

Miller M.J., Yuan B.-Z. (1997): Semiautomated resolution of overlapping stutter patterns in genomic microsatellite analysis. *Analytical Biochemistry* 251, 50-56.

Primmer, C.R., Miller, A.P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5, 365-378.

Primmer, C.R., Painter, J.N., Koskinen, M.T., Palo, J.U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36, 348-360.

Ramel, C. (1997): Mini- and Microsatellites. *Environmental Health Perspectives* 105, 781-789.

Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009): Genetika. Masarykova univerzita, Brno.

Šeda, O., Liška, F., Šedová, L. (2005): Aktuální genetika - Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky. Publikováno online <http://biol.lf1.cuni.cz>, navštíveno 4. 7. 2011.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (2005): Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita, Brno.

Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros Praha

Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10, 967-981.

Vergnaud, G., Denoeud, F. (2000): Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Research* 10, 899-907.

Walsh P.S., Fines N.J., Reynolds R. (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* 24, 2807-2812.

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.

Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, J. (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.