

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2011

Iveta Bartoňková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza polymorfních *cross-species* mikrosatelitů
pro determinaci paternity u vybraných zástupců
čeledi Motacillidae**

Bakalářská práce

Iveta Bartoňková

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. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D za přínosné odborné rady a připomínky, poskytnutí materiálů, věnovaný čas a přátelský přístup v průběhu psaní mé bakalářské práce. Velký dík patří také kolegům z Laboratoře populační genetiky za příjemné pracovní prostředí a psychickou podporu.

Souhrn

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů metodou *cross-species* PCR amplifikace u pěti druhů čeledi konipasovitých – u lindušky lesní (*Anthus trivialis*), rudokrké (*A. cervinus*) a skalní (*A. petrosus littoralis*) a konipase horského (*Motacilla cinerea*) a bílého (*M. alba*). Testovala jsem celkem 33 párů primerů odvozených od příbuzných druhů pěvců, které jsem zvolila na základě jejich polymorfního produktu u některých z dalších druhů konipasovitých. Nalezla jsem celkem 6 mikrosatelitových lokusů dávajících polymorfní produkt u všech pěti testovaných druhů, s počtem alel v rozmezí 3-9 alel na lokus. Dále jsem identifikovala dva lokusy, které by teoreticky mohly být využity k odlišení rodů *Anthus* a *Motacilla*. Nejvíce polymorfních lokusů jsem zaznamenala u lindušky lesní, naopak nejméně u lindušky skalní.

Summary

In this bachelor thesis I dealt with the search for polymorphic microsatellite loci using the method of cross-species PCR amplification in five species of the Motacillidae family – tree pipit (*Anthus trivialis*), red-throated pipit (*A. cervinus*) and rock pipit (*A. petrosus littoralis*) and grey wagtail (*Motacilla cinerea*) and white wagtail (*M. alba*). I tested 33 primer pairs designed for related species of passerines that I had chosen according to their previous polymorphic product found in other species in the Motacillidae family. I found 6 microsatellite loci which were polymorphic in all five tested species, with number of alleles in range from 3 to 9 alleles per locus. I also found two loci that could have been theoretically used to distinct genus *Anthus* from genus *Motacilla*. The highest number of polymorphic loci was found in tree pipit, the lowest on the other hand in rock pipit.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíl práce	8
3	Literární přehled	9
3.1	Taxonomické členění čeledi konipasovitých (Motacillidae)	9
3.2	Charakteristika čeledi konipasovitých	11
3.3	Partnerské vztahy ptáků a mimopárové oplození	12
3.4	Repetitivní sekvence DNA	13
3.4.1	Satelity	14
3.4.2	Minisatelity	14
3.4.3	Mikrosatelity	15
3.4.3.1	Vznik a mutační mechanismy mikrosatelitových lokusů	16
3.4.3.2	Funkce a význam mikrosatelitů	17
3.5	Identifikace nových mikrosatelitových lokusů	18
3.5.1	Izolace mikrosatelitů de novo	18
3.5.2	<i>Cross-species</i> PCR amplifikace u ptáků	19
3.6	Analýza mikrosatelitových lokusů	20
3.6.1	PCR	20
3.6.2	Elektroforetická separace PCR produktů	21
3.6.3	Problémy hodnocení PCR produktů	22
3.6.3.1	Stutter bandy	22
3.6.3.2	Nulové alely	23
3.6.3.3	Alelová homoplazie	23
3.6.3.4	Problémy spojené s nízkou koncentrací DNA	24
3.6.4	Budoucnost analýzy mikrosatelitů	25
3.7	Mikrosatelity u čeledi konipasovitých	25
4	Materiál a metodika	27
4.1	Biologický materiál	27
4.2	PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů	27
4.2.1	Mikrosatelitové lokusy testované PCR amplifikací	28
4.3	Analýza PCR produktů	30
4.4	Použité chemikálie	32
4.5	Použité roztoky	33
4.6	Vybavení laboratoře	35
5	Výsledky	36
6	Diskuze	47
7	Závěr	57
8	Seznam použitých zkratk	58
9	Seznam použité literatury	59

1 Úvod

Mikrosatelity jsou tandemové repetice s délkou základního motivu 1-6 bp. Byly prozatím objeveny v genomu všech zkoumaných organismů, a to prokaryotních i eukaryotních. Díky své relativně vysoké mutační rychlosti, která má za následek výrazný alelový polymorfismus, nacházejí své uplatnění jako molekulární markery. Používají se při forenzních analýzách, fylogenetických a populačních studiích či mapování genomu. Hrají také roli u některých dědičných onemocnění (Huntingtonova choroba, Syndrom fragilního X).

Ve své bakalářské práci se budu zabývat hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů u pěti druhů čeledi konipasovitých (Motacillidae) – lindušky lesní (*Anthus trivialis*), rudokrké (*A. cervinus*) a skalní (*A. petrosus littoralis*) a konipase horského (*Motacilla cinerea*) a bílého (*M. alba*). K tomuto účelu bude použita metoda *cross-species* PCR amplifikace s použitím celkem 33 párů primerů, které byly v minulosti buď odvozeny, nebo dávaly polymorfní produkty u některého z dalších zástupců této čeledi. Po provedení PCR budou jednotlivé vzorky rozděleny v 6% polyakrylamidovém gelu a u polymorfních lokusů bude stanoven počet alel.

2 Cíl práce

- Shromáždění dostupných literárních zdrojů
- Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce
- PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů s využitím *cross-species* primerů, které jsou známé od taxonomicky příbuzných druhů ptáků u konipase bílého (*Motacilla alba*) a horského (*M. cinerea*) a u lindušky lesní (*Anthus trivialis*), rudokrké (*A. cervinus*) a skalní (*A. petrosus*)

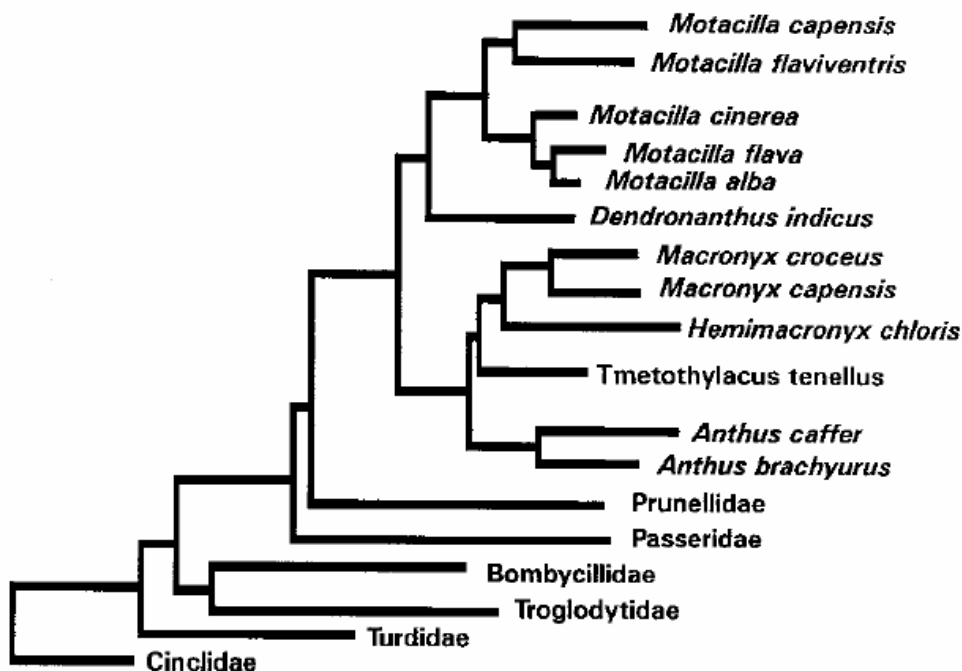
3 Literární přehled

3.1 Taxonomické členění čeledi konipasovitých (Motacillidae)

V současné době se v rámci čeledi konipasovitých, řád pěvci (Passeriformes), rozlišuje celkem 6 rodů a to 3 hlavní (*Motacilla*, *Anthus* a *Macronyx*), 2 monotypické rody (*Tmetothylacus* a *Dendronanthus*) a znovuzavedený rod *Hemimacronyx* (Voelker *et* Edwards, 1998). Do této čeledi se řadí 54 až 58 druhů, přičemž tato hodnota kolísá na základě rozlišování jednotlivých druhů a poddruhů (Camfield, 2004).

Fylogenetické studie ukazují, že čeleď konipasovitých je blízce příbuzná s čeledí pěvuškovitých (Prunellidae) a vrabcovitých (Passeridae) (Voelker *et* Edwards, 1998). Vnitřní struktura předpokládá příbuznost rodu *Motacilla* s rodem *Dendronanthus* v jedné vývojové skupině, ve druhé pak propojení rodů *Anthus* a *Macronyx* přes spojnicí tvořenou rody *Tmetothylacus* a *Hemimacronyx* (Clancey, 1994).

Obr. 1: Pravděpodobné členění čeledi konipasovitých (Voelker *et* Edwards, 1998).



V obecném slova smyslu lze čeleď konipasovitých rozdělit do dvou základních skupin, a to na konipasů a lindušky (Clancey, 1994).

Skupina konipasů zahrnuje na poddruhy nejbohatší rod *Motacilla*, do kterého náleží celkem 11 druhů, avšak s obrovskou vnitřní variabilitou, kde jen u konipase lučního (*Motacilla flava*) bylo popsáno 17 poddruhů na základě sezónního opeření (Clancey, 1994). Podle zbarvení a obývaných biotopů lze rod *Motacilla* rozdělit do 3 skupin (Keith *et al.*, 1992):

1. žlutí konipasi (*M. capensis*, *M. citreola*, *M. flava* a *M. flaviventris*) obývají oblast Eurasie, severní Afriky a Madagaskaru a vyskytují se na vlhkých loukách a březích vodních toků.
2. říční konipasi (*M. cinerea* a *M. clara*) žijí u rychle tekoucích řek a zbarvením jsou podobní druhu *M. capensis*.
3. pestrobarevní konipasi (*M. aguimp*, *M. alba*, *M. grandi*, *M. lugens* a *M. madaraspatensis*) žijí v palearktické oblasti, Africe, Indii a Japonsku u břehů vod a v příměstských oblastech a jejich opeření postrádá jakékoliv žluté zbarvení.

Společně s rodem *Motacilla* se do skupiny konipasů řadí i konipas pralesní (*Dendronanthus indicus*), který je černobíle zbarvený a obývá oblast jižní a jihovýchodní Asie (Keith *et al.*, 1992). Někteří autoři však začleňují konipase pralesního do skupiny lindušek kvůli podobnostem v chování a způsobu života (Voelker *et Edwards*, 1998).

Mezi lindušky patří zbývající 4 rody konipasovitých (Clancey, 1994). Rod *Macronyx* zahrnuje celkem 7 endemických druhů obývajících různé oblasti subsaharské Afriky (Keith *et al.*, 1992). Všeobecně jsou větší než zástupci rodu *Anthus* a mají pestřeji zbarvenou ventrální stranu těla. Oproti tomu lindušky rodu *Anthus* jsou zbarvené krypticky a rozdělují se přibližně na 40 druhů, které jsou rozprostřeny víceméně po celém světě. Pomyslnou spojnicí mezi těmito dvěma rody tvoří monotypický rod *Tmetothylacus* s endemickým druhem *T. tenellus* z východní Afriky a rod *Hemimacronyx* zahrnující dva druhy: *H. sharpei* z keňských horských luk a *H. chloris* obývající Dračí hory v jihovýchodní Africe (Clancey, 1994). Tyto dva endemické druhy byly původně zařazovány do jiných skupin jako *Macronyx sharpei* a *Anthus chloris*, po důkladném přezkoumání byly ale kvůli mnoha odlišnostem spojeny pod nový rod, který však není akceptován všemi autory.

3.2 Charakteristika čeledi konipasovitých

Zástupci čeledi konipasovitých jsou vesměs malí až středně velcí ptáci obývající celý svět kromě Antarktidy a tichomořských ostrovů (Hanzák *et* Hudec, 1974).

Z morfologického hlediska se jedná o ptáky velké 14 až 21 cm a vážící 12 až 50 g s dlouhým ocasem, štíhlým tělem, krátkým krkem a poměrně velkými pařáty, které u některých druhů lindušek (rod *Macronyx*) mohou dosahovat délky až 4 cm (Camfield, 2004). Mají útlý špičatý zobák se zřetelným nosním operkulem a postranními štětinami v okolí zobáku (Keith *et al.*, 1992). Opeření je u lindušek krypticky hnědavé s kropenatou spodní částí těla, u rodu *Macronyx* a konipasů se žlutými nebo bílými prvky. U většiny druhů není zřetelný pohlavní dimorfismus, výjimku tvoří rody *Motacilla* a *Tmetothylacus*, kde samci bývají pestřejší a o málo větší než samice.

Všichni konipasovití jsou primárně hmyzožraví ptáci, čas od času však nepohrdnou ani koryši, kroužkovci, mlži, semeny nebo bobulemi (Camfield, 2004). Sami jsou však potravou sokolů (čeleď Falconidae) či sov (čeleď Strigiformes). Mláďata a vejce jsou také cílem některých savců jako jsou kočky domácí nebo hlodavci.

Konipasovití jsou ve většině případů monogamní ptáci, ačkoliv polygynie a mimopárové oplození nebývá výjimkou (Camfield, 2004). Hnízdí většinou na zemi nebo v mezerách skal, kde kladou obvykle 3 až 7 vajec. Samice sedí na vejcích 10 až 15 dní, zatímco samec přináší potravu. O vylíhlá mláďata se následně starají oba rodiče, a to o jejich krmění hmyzem i čištění hnízda od výkalů. Stejně jako většina malých ptáků se i konipasovití dožívají v průměru 2 až 5 let. Nejstarší zdokumentovaný jedinec uhynul ve věku 9 let a 11 měsíců a šlo o konipase bílého.

Z hlediska chování jsou někteří ze zástupců samotářští, jiní žijí v hejnech. Během hnízdního období jsou silně teritoriální a brání svá území zpěvem či předváděcími lety (Camfield, 2004). Jsou to především ptáci terestričtí, vyskytují se však také ve skalách, křovinách či na stromech. Vyznačují se svým houpavým letem a způsobem zpěvu, čímž se odlišují od velice podobných skřivanů (Hume, 2004). Kromě několika druhů jde o ptáky stěhovavé (Keith *et al.*, 1992), většinou přezimující v Africe. Vzájemně spolu komunikují zpěvem a vizuálními projevy (Camfield, 2004). Jejich písně jsou u některých druhů krátké a jednoduché, u ostatních druhů naopak dlouhé a komplexní.

V Evropě se vyskytuje celkem 13 druhů lindušek rodu *Anthus*, z toho 10 hnízdících: linduška dlouhozobá (*A. similis*), horská (*A. spinoletta*), kanárská (*A.*

berthelotii), lesní (*A. trivialis*), luční (*A. pratensis*), rudokrká (*A. cervinus*), sibiřská (*A. gustavi*), skalní (*A. petrosus*), úhorní (*Anthus campestris*) a zelená (*A. hidgsoni*), a 3 zalétající: linduška mongolská (*A. godlewskii*), Richardova (*A. richardii*) a žlutobřichá (*A. rubescens*), a 4 druhy konipasů rodu *Motacilla*: konipas bílý (*M. alba*), citronový (*M. citreola*), luční (*M. flava*) a horský (*M. cinerea*) (Svensson *et al.*, 2004).

Žádný z druhů konipasovitých není podle IUCN zařazen mezi kriticky ohrožené, dva druhy patří do skupiny ohrožených a tři druhy do skupiny zranitelných (Camfield, 2004). Mezi hlavní faktory, které je ohrožují, patří ztráta přirozeného prostředí a zavlečené druhy jiných živočichů. Ačkoli někteří konipasi a lindušky dokáží vytěžit maximum z odlesňování krajiny, zvyšuje se tak pro ně i riziko útoku predátorů, a to na dospělé jedince i hnízda. Lindušky rozmnožující se v arktických a horských oblastech reagují také na vyrušení lidskou činností. Očekává se také negativní vliv změn klimatu na složení a rozšíření jednotlivých druhů.

3.3 Partnerské vztahy ptáků a mimopárové oplození

U ptáků se rozlišují 3 základní typy partnerských svazků, které se liší dobou trvání a typem svazku (Veselovský, 2001). Jedná se o monogamii, polygamii (polyandrie, polygynie a polygynandrie) a promiskuitu.

Monogamie je vztah jednoho samce s jedinou samicí často s rozdělením starostí rovnoměrně mezi oba rodiče, čímž se zvyšuje pravděpodobnost přežití mláďat (Veselovský, 2001). V případě polygamie jde o vzájemné soužití více jedinců ve více hnízdech, kde podle zastoupení jednotlivých pohlaví ve skupině lze rozlišit polygynii (1 samec s více samicemi), polyandrii (1 samice s více samci) a polygynandrii neboli kooperativní polyandrii (několik samců s několika samicemi). Promiskuita pak představuje volné krátkodobé svazky, kde samice přebírají veškerou péči o potomstvo.

Ačkoliv byla dlouho uznávána teorie, že více než 90 % ptačích druhů je monogamních, v posledních letech se ukazuje, že tomu tak není (Griffith *et al.*, 2002). Po zavedení molekulárních technik do výzkumu paternity ptáků bylo zjištěno, že frekvence mimopárových potomků (EPO; *Extra-pair offspring*) v některých populacích může dosahovat až 70 %. Vzhledem k tomuto faktu jsou nyní druhy klasifikovány jako tzv. geneticky nebo sociálně monogamní (Neudorf, 2004). Geneticky monogamní druhy se páří výhradně v pevně utvořených párech, oproti tomu u sociálně monogamních dochází k časté mimopárové kopulaci (EPC; *Extra-pair copulation*), která může skončit

mimopárovým oplozením (EPF; *Extra-pair fertilization*) a následnou mimopárovou paternitou (EPP; *Extra-pair paternity*). U pěvců, kteří byli původně považováni za monogamní skupinu, se udávají hodnoty genetické monogamie jen 14 %, tedy u 86 % pozorovaných druhů byla pozorována EPP (Griffith *et al.*, 2002).

Počet EPO se liší mezi jednotlivými druhy a pohybuje se v rozsahu od 0 % (genetická monogamie) až po 72 % u modropláštěníka nádherného (*Malurus cyaneus*) (Griffith *et al.*, 2002). Tyto rozdíly v míře EPP mezi jednotlivými druhy jsou pravděpodobně spojeny se stylem života, způsobem rodičovské péče a s izolovaností hnízdících párů. Udává se také, že EPP je nižší u ostrovních populací a u populací, které prošly efektem hrdla lahve (Neudorf, 2004).

Výhodou EPP z pohledu samce je zvýšení počtu potomků, čímž se zvýší i ekologická zdatnost daného jedince (Veselovský, 2001). Rozdělení potomků do více hnízd má za následek i snížení pravděpodobnosti útoku predátorů nebo úhynu. Pro samici je EPP výhodná z důvodu menšího rizika inkubace neoplozených vajec při neplodnosti samce a zároveň zajištění dalšího příjmu potravy pro sebe i mláďata od nového partnera. Nevýhodou pro obě pohlaví pak může být ztráta stálého partnera při velmi vysokém stupni mimopárových aktivit.

Studium EPP u ptáků se provádí na základě DNA fingerprintingu a analýzy mini- a mikrosatelitové DNA (Griffith *et al.*, 2002). Je založeno na detekci daného lokusu a na zjištění počtu různých alel u všech zkoumaných jedinců. Základním předpokladem studia EPP je dědičnost mikrosatelitových lokusů podle pravidel Mendelovské dědičnosti, kdy potomek může zdědit alely jen od rodičů. Podle tohoto faktu lze při zanedbání pravděpodobnosti mutace přesně stanovit paternitu u všech mláďat v rámci studované populace.

3.4 Repetitivní sekvence DNA

U prokaryotních organizmů je většina genomu tvořena geny kódujícími proteiny a geny pro tRNA a rRNA (Campbell *et al.*, 2005). Nekódující sekvence jsou oblastí s regulační funkcí a geny nejsou přerušovány introny. Oproti tomu eukaryotický genom obsahuje mnohem více nekódujících sekvencí, což má za následek, že oblasti účastnící se proteosyntézy zabírají např. v genomu člověka jen 1,5 %.

Jako repetitivní sekvence se označují nekódující sekvence DNA vyskytující se v genomu ve více kopiích, jejichž počet může v některých případech dosahovat až

k tisícům (Pollard *et al.*, 2007). Podle uspořádanosti se repetitivní sekvence dělí na rozptýlené a tandemové.

Rozptýlené repetitivní sekvence DNA se vyskytují v celém genomu (Campbell *et al.*, 2005). Řadí se k nim především mobilní genetické elementy jako jsou transpozóny a retrotranspozóny (Pollard *et al.*, 2007). Jedná se o malé úseky DNA schopné přesouvat se z jednoho místa DNA na jiné přes intermediární molekuly – přes DNA u transpozónů a přes RNA u retrotranspozónů. K neznámějším retrotranspozónům patří krátké rozptýlené repetice (SINEs, *Short interspersed nuclear elements*) a dlouhé rozptýlené repetice (LINEs, *Long interspersed nuclear elements*). Udává se, že mobilní genetické elementy tvoří 25-50 % savčího genomu a ještě větší podíl zaujímají u obojživelníků a rostlin (Campbell *et al.*, 2005).

Tandemové repetitivní sekvence jsou tvořeny velkým počtem kopií uspořádaných těsně za sebou a podle délky základní repetice se dělí na 3 základní skupiny – satelity, minisatelity a mikrosatelity (Bennett, 2000).

3.4.1 Satelity

Satelity byly první tandemovou repeticí, která byla objevena (Bennett, 2000). Mají základní jednotku repetice dlouhou v řádu několika stovek bp a jejich celková délka může dosahovat až několika Mb. Vyskytují se v heterochromatinu, především v centromerických oblastech. Jejich biologická funkce prozatím není známa a kvůli obrovské velikosti nemají většího využití jako molekulární markery.

3.4.2 Minisatelity

Obecně jsou minisatelity vnímány jako tandemově se opakující krátké repetice, jejichž celková délka dosahuje od 0,5 kb až po několik kb (Vergnaud *et al.*, 2000) a délka základního motivu se uvádí nejčastěji v rozmezí 10 až 100 bp (Buschiazzi *et al.*, 2006, Bhargava *et al.*, 2010), v některých případech 6 až 100 bp (Vergnaud *et al.*, 2000).

V rámci minisatelitů je možné rozlišit dvě podskupiny: telomerické a hypervariabilní (Bennett, 2000). První zmíněné telomerické minisatelity jsou tvořeny vysoce konzervativními oblastmi DNA, které se vyskytují na koncích chromozomů. Jsou složeny z 10-15 kb dlouhých úseků tvořených hexanukleotidovými tandemovými

repeticemi. Jejich hlavní funkcí je ochrana konců chromozomů před degradací a určení konce replikace, dále pak hrají roli v párování a orientaci chromozomů během dělení či ve stárnutí buněk.

Druhou skupinou jsou hypervariabilní minisatelity označované také jako VNTRs lokusy (*Variable number of tandem repeats*) (Bennett, 2000). Počet repetice se výrazně liší mezi druhy i jedinci daného druhu, což je základem vysokého stupně polymorfismu těchto sekvencí. Právě díky vysokému polymorfismu byly prvními multialelovými markery používanými při DNA fingerprintingu a při srovnávacích studiích (Vergnaud *et* Denoeud, 2000).

Minisatelity byly poprvé popsány u člověka a s postupem času nalezeny také u mnoha dalších organismů včetně bakterií (Vergnaud *et* Denoeud, 2000). V současné době se využití minisatelitů zaměřuje na jejich citlivost k genotoxickým agens, ke kterým patří například ionizující záření. Právě minisatelity by mohly být použity při studiu jejich účinků.

3.4.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity bývají také označovány jako STRs (*Single tandem repeats*) nebo SSRs (*Simple sequence repeats*) a společně s minisatelity bývají řazeny do skupiny VNTRs lokusů (Buschiazzo *et* Gemmell, 2006; Bhargava *et* Fuentes, 2010).

Délka základní jednotky repetice se v případě mikrosatelitů uvádí nejčastěji v rozmezí 1 až 6 bp (Tóth *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Buschiazzo *et* Gemmell, 2006). Někteří autoři k nim však řadí i sekvence s délkou repetice 7 až 9 bp, aby došlo k návaznosti mezi mini- a mikrosatelitovými sekvencemi (Bhargava *et* Fuentes, 2010).

Mikrosatelity se mohou dělit dle dvou základních kritérií, a to podle délky repetice a podle vnitřní struktury repetice. Podle první možnosti se rozlišují mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové mikrosatelity (Tóth *et al.*, 2000). Podle druhého kritéria se mikrosatelitové lokusy dělí do celkem 4 skupin: dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené (Oliveira *et al.*, 2006). Dokonalé mikrosatelity jsou tvořeny jedinou souvislou sekvencí nukleotidů. U nedokonalých je tato sekvence přerušena párem nukleotidů a u přerušovaných mikrosatelitů pak více než dvounukleotidovou sekvencí. Složené mikrosatelity mají jednotku repetice složenou z minimálně dvou souvislých jednoduchých sekvencí nukleotidů.

Mikrosatelitové sekvence byly nalezeny v genomu všech dosud zkoumaných prokaryotních i eukaryotních organizmů, a to v kódujících i nekódujících oblastech (Tóth *et al.*, 2000, Buschiazzo *et Gemmell*, 2006). Přitom bylo dokázáno, že v případě eukaryot jsou mikrosatelity častější v nekódujících oblastech než v exonech. Příčinou může být vysoká mutabilita mikrosatelitů, čímž by docházelo ke změnám genetické informace (Tóth *et al.*, 2000).

V případě ptáků se uvádí mnohonásobně nižší frekvence mikrosatelitových lokusů než u ostatních eukaryotních organizmů (Primmer *et al.*, 1997). Příčinou tohoto faktu může být daleko menší genom oproti například savcům v důsledku adaptace k létání, což poskytuje menší prostor pro repetitivní DNA, nebo nedostatek sekvencí, ze kterých by mohly mikrosatelity vzniknout.

3.4.3.1 Vznik a mutační mechanismy mikrosatelitových lokusů

Mikrosatelity vznikají buď mutací z jedinečných sekvencí DNA (*de novo* mikrosatelity), nebo jsou v primární formě přeneseny pomocí mobilních elementů (tzv. adoptované mikrosatelity) (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006).

De novo mikrosatelity se vytvářejí z protomikrosatelitových sekvencí, což jsou krátké repeticce obsahující 3 až 4 opakující se jednotky (Bhargava *et Fuentes*, 2010). Dříve se předpokládalo, že vznikají jednoduchou substitucí (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006). Dnes však převládá názor, že protomikrosatelity se tvoří z jedinečných sekvencí inzercí a následným zkopírováním přilehlých bází. Tato teorie byla dokázána pozorováním mutantních lidských genů, kde až 70 % všech 2 až 4 nukleotidových inzercí vyústila ve vznik 2 až 5 nových repetice, které byly klasifikovány jako nové mikrosatelitové lokusy vzniklé z jedinečných sekvencí DNA (Bhargava *et Fuentes*, 2010).

U adoptovaných mikrosatelitů se předpokládá vznik přenesením z jiného místa genomu přes transpozóny (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006; Bhargava *et Fuentes*, 2010). Nejčastěji zmiňovanými jsou v tomto kontextu krátké a dlouhé rozptýlené repeticce (SINEs a LINEs) vyskytující se u eukaryot. Obecně se uvádí, že transpozóny obsahují jedno nebo více míst vhodných ke vzniku mikrosatelitů. PolyA sekvence na 3' konci SINEs a LINEs elementů je u savců ideálním místem pro chyby reverzní transkriptázy, čímž může dojít ke vzniku na A bohatých mikrosatelitů. Právě absence této sekvence u ptáků se uvádí jako jeden z důvodů nízkého výskytu mikrosatelitových lokusů.

Za prodlužování i zkracování mikrosatelitových repetic jsou zodpovědné především dva procesy – sklouznutí DNA polymerázy a rekombinace, tedy nerovnoměrný *crossing-over* a genová konverze (Bhargava *et* Fuentes, 2010). Jako sklouznutí DNA polymerázy se označuje proces založený na chybné reasociaci řetězců DNA v průběhu replikace vedoucí k vytvoření smyčky (Ellegren, 2004). Podle templátového řetězce poté dojde k reparaci vedoucí buď ke zkrácení nebo prodloužení mikrosatelitové sekvence o jednu nebo více repetic. Většina primárních mutací je přitom opravena reparačními mechanismy, a proto jen malé procento těchto posunů vyústí ve vytvoření nové alely.

Rekombinace, hlavně nerovnoměrný *crossing-over*, má za následek rozsáhlé změny v rámci VNTR lokusů (Ellegren, 2004). Jedná se o nehomologickou výměnu úseků buď nesesterských chromatid nebo naprosto odlišných chromozómů, který může vyústit v rozsáhlé změny počtu repetitic v rámci VNTR lokusů a tím k vytvoření nových alel. Je to hlavní mechanismus evoluce minisatelitů a jeho vliv na mikrosatelitové sekvence je předmětem výzkumu. Hlavním důvodem pro zvažování nerovnoměrného *crossing-overu* jako mutačního mechanismu mikrosatelitů je souvislost rozložení mikrosatelitových sekvencí v genomu a míst zvýšeného výskytu rekombinace, tzv. *recombination hotspots* (Bhargava *et* Fuentes, 2010).

Mutační rychlost mikrosatelitů je všeobecně vysoká, pohybující se od 10^{-2} u *Escherichia coli* po 10^{-6} u vyšších eukaryot (Bhargava *et* Fuentes, 2010). Tato rychlost kolísá podle několika faktorů jako je typ, délka a struktura repetice, umístění v rámci genomu a individuální faktory (např. věk, pohlaví nebo životní prostředí, ve kterém jedinec žije) (Buschiazzi *et* Gemmell, 2006).

3.4.3.2 Funkce a význam mikrosatelitů

Funkce mikrosatelitních sekvencí je prozatím nejasná a původně byly považovány jen za neutrální evoluční markery (Li *et al.*, 2002). Nyní se udává, že jejich funkce spočívá v organizaci chromozómů a regulaci rekombinace, replikace DNA a buněčného cyklu a genové aktivity. Bylo také prokázáno, že trinukleotidové mikrosatelity hrají roli v lidských dědičných chorobách jako jsou neurodegenerativní choroby (např. Huntingtonova choroba nebo Syndrom fragilního X) a některé typy rakoviny (Tóth *et al.*, 2000).

Díky své vysoké variabilitě i u organismů s malou genetickou diverzitou a jednoduchým postupem analýzy se staly mikrosatelity molekulárními markery s obrovským spektrem využití (Zima *et al.*, 2004; Selkoe *et Toonen*, 2006). Nacházejí své uplatnění v mapování genomu, forenzních analýzách a populačních studiích jako je určování paternity, velikosti a struktury populací nebo studium toku genů. Mohou také sloužit ke studiu hybridních zón.

Jako každá metoda má i analýza mikrosatelitových lokusů své nevýhody (Selkoe *et Toonen*, 2006). K nim patří především složitý proces hledání druhově specifických mikrosatelitů, nutnost hledání mikrosatelitů pro každý nově zkoumaný organismus a nejasné mutační mechanismy. Dále pak skrytá alelová diverzita v podobě nulových alel a alelové homoplazie, o kterých bude pojednáno v samostatné kapitole.

3.5 Identifikace nových mikrosatelitových lokusů

Vzhledem k vysokému stupni délkového polymorfismu se mikrosatelity staly široce používanými molekulárními markery velice brzy po svém objevení (Zane *et al.*, 2002). Nahradily tak dříve používané metody jako je analýza alozymů, RFLP či RAPD. Při hledání STR lokusů se uplatňují dva základní postupy: izolace mikrosatelitů *de novo* a *cross-species* amplifikace.

3.5.1 Izolace mikrosatelitů *de novo*

Tradiční postup izolace mikrosatelitů lze popsat v několika krocích (Zane *et al.*, 2002):

1. Izolace genomické DNA zkoumaného druhu a její fragmentace pomocí restričních enzymů nebo sonikace.
2. Elektroforetická separace restričních produktů a selekce krátkých úseků o délce 300-700 bp.
3. Vložení elektroforézou získaných fragmentů do plazmidového vektoru a jeho následné vnesení do kompetentních bakterií.
4. Selekcce pozitivních klonů pomocí *blottingu* a hybridizací se sondami obsahujícími repetitivní sekvence.
5. Namnožení dostatečného množství bakterií obsahujících plazmid s vloženými mikrosatelitovými sekvencemi.

6. Sekvenace daného lokusu a v případě výskytu dostatečně dlouhých jedinečných sekvencí v jeho okolí navržení primerů.
7. Kontrolní PCR k otestování funkčnosti a spolehlivosti získaných primerů.
8. Zjištění polymorfismu nalezených mikrosatelitových lokusů na kontrolní skupině jedinců.

Toto základní schéma založené na *screeningu* genomických knihoven je společné pro většinu metod (Zane *et al.*, 2002). Kvůli nízkému množství pozitivních klonů získaných tímto postupem (0,04 až 12 %) je však vhodný pouze pro druhy obsahující vysoký podíl mikrosatelitových lokusů v genomu nebo pro studie, kde není vyžadováno mnoho molekulárních markerů. Proto jsou vytvářeny modifikace této metody. Tyto modifikace mají základ v jiných metodách jako je RAPD nebo AFLP a jejich základní myšlenkou je vyhnout se vytváření genomických knihoven, kde dochází nejčastěji k chybám a ztrátám repetitivních sekvencí. Přestože úspěšnost těchto metod může dosahovat i 100 %, nejsou v této době příliš využívány.

Ani tyto modifikace však nemohou odstranit hlavní nevýhody izolace mikrosatelitů *de novo*, čímž jsou extrémní časová náročnost a poměrně vysoké finanční náklady (Zane *et al.*, 2002). V kombinaci s faktem, že prvním krokem každého výzkumu nového druhu pomocí mikrosatelitů musí být jejich izolace z genomu daného druhu, se izolace mikrosatelitů *de novo* stává metodou nevhodnou pro rozsáhlejší studie. Proto se obzvláště u skupin nepříliš bohatých na mikrosatelitové sekvence využívá především metoda *cross-species* amplifikace, tedy využití PCR primerů navržených podle mikrosatelitových sekvencí příbuzných druhů.

3.5.2 *Cross-species* PCR amplifikace u ptáků

Vzhledem k tomu, že ptačí genom obsahuje přibližně desetkrát méně mikrosatelitů než například lidský genom, stala se u nich metoda *cross-species* amplifikace nedocentelným postupem při hledání mikrosatelitových lokusů (Galbusera *et al.*, 2000).

Úspěšnost *cross-species* amplifikace závisí na několika faktorech, z nichž nejdůležitější je evoluční příbuznost zdrojového a zkoumaného druhu (Primmer *et al.*, 1996). S rostoucí evoluční vzdáleností totiž stoupá pravděpodobnost mutace v okrajových částech mikrosatelitové sekvence, čímž dochází ke vzniku nehomologních

sekvencí v oblastech nasedání PCR primerů (Primmer *et al.*, 2005). Úměrně se vzrůstající evoluční vzdáleností tak klesá pravděpodobnost úspěšnosti *cross-species* amplifikace a také polymorfismu amplifikovaných lokusů.

Kromě evoluční vzdálenosti zdrojového a zkoumaného druhu ovlivňují *cross-species* amplifikaci i další faktory (Primmer *et al.*, 2005). Patří k nim teplota *annealingu* při PCR a délka repetic daného mikrosatelitu. Bylo dokázáno, že snížení teploty *annealingu* zvyšuje úspěšnost amplifikace a s ní pravděpodobnost zachycení polymorfismu. Tato vlastnost je nezávislá na evoluční vzdálenosti daných dvou druhů. V souvislosti s tímto zjištěním se při prvním zkoumání vždy stanovuje nižší teplota *annealingu* než byla stanovena u zdrojového druhu, aby bylo zachyceno maximum polymorfních lokusů.

Zároveň se uvádí, že má-li mikrosatelit u zdrojového druhu více než 20 jednotek repetic je pravděpodobnost polymorfismu u zkoumaného druhu o 56 % vyšší než u mikrosatelitů kratších než 10 jednotek repetic (Primmer *et al.*, 2005). Tato vlastnost souvisí se zachováním delších sekvencí i u evolučně vzdálenějších druhů a zajišťuje tak i u nich určitou pravděpodobnost úspěšnosti amplifikace.

Využití *cross-species* amplifikace se v současnosti značně rozšiřuje (Primmer *et al.*, 2005). Používá se nejen k detekci mikrosatelitů u nejrůznějších druhů, ale také v populačních studiích, zjišťování paternity či zkoumání příbuznosti dvou a více druhů v rámci jednoho rodu. Poslední možnosti se využívá nejčastěji při konstrukci fylogenetických stromů, kdy informace zjištěné studiem polymorfních mikrosatelitních lokusů společně se studiem mitochondriální DNA jsou nedocenitelným zdrojem informací o evolučních mechanismech.

3.6 Analýza mikrosatelitových lokusů

Nejčastěji používaný postup analýzy mikrosatelitů sestává z PCR a následné elektroforetické separace PCR produktů (Koreth *et al.*, 1996).

3.6.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR; *Polymerase Chain Reaction*) se od svého objevení stala jednou ze základních technik molekulární biologie (Brown, 2007). Jedná

se o cyklický proces umožňující namnožení určitého úseku DNA a jeho následnou analýzu.

Hlavními složkami PCR reakční směsi jsou templátová DNA, DNA polymeráza, čtyři typy deoxyribonukleosidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a dva oligonukleotidové primery. K úspěšnému proběhnutí reakce je dále nezbytný pufr, jehož koncentrace a pH se volí podle typu DNA polymerázy, a hořčičnaté ionty přidávané ve formě $MgCl_2$. Směs se doplňuje do požadovaného objemu deionizovanou vodou.

Základní cyklus PCR sestává ze tří kroků. Prvním je denaturace dvoušroubovice DNA při teplotě 94 °C. Následuje snížení teploty reakční směsi na teplotu *annealingu*, při které dochází k nasedání primerů. Tato teplota se obvykle pohybuje v rozmezí 45-65 °C. Posledním krokem je opětovné zvýšení teploty na 72 °C. Tím dochází k aktivaci *Taq* DNA polymerázy a syntéze nových vláken DNA. Tento cyklus se opakuje 25-35x v závislosti na požadované konečné koncentraci PCR produktu.

Klíčovou složkou PCR směsi je termostabilní DNA polymeráza (Brown, 2007). Právě termostabilita tohoto enzymu je nezbytnou podmínkou úspěšné PCR amplifikace, neboť zajišťuje udržení konformace a tím i funkčnost enzymu při zvýšení teploty na 94 °C.

Největší výhodou PCR spočívá v její jednoduchosti a relativně malé časové i finanční náročnosti. Díky těmto vlastnostem umožnila PCR rozvoj tehdejších biologických směrů a také vývoj směrů naprosto nových jako je například archeogenetika, molekulární ekologie či analýza DNA v soudním lékařství (Brown, 2007). PCR je tak nedocenitelnou metodou při studiu evoluce člověka, ekologických studiích nebo i v boji proti kriminalitě.

3.6.2 Elektroforetická separace PCR produktů

Elektroforetická separace je založena na záporném náboji molekul DNA, který jim umožňuje se pohybovat v elektrickém poli stejnosměrného napětí od záporného pólu ke kladnému. Podle velikosti pórů v gelu dochází následně k rozdělení jednotlivých fragmentů podle velikosti.

K separaci PCR produktů se využívá agarózový nebo polyakrylamidový gel v závislosti na požadované kvalitě vlastní separace. Detekce jednotlivých frakcí se následně provádí pomocí radioaktivního nebo neradioaktivního značení (Koreth *et al.*,

1996). Radioaktivně lze detekovat DNA pomocí radioaktivních izotopů fosforu. Neradioaktivní metody jsou založeny na barvení DNA fluorescenčními barvivy, například ethidium bromidem, nebo stříbrem ve formě stříbrných kationtů.

Analýza mikrosatelitových sekvencí se provádí na základě PCR amplifikace daného lokusu párem primerů, které jej ohraničují. Produkt PCR reakce je následně analyzován pomocí elektroforetických metod. V závislosti na počtu opakujících se jednotek, tedy podle hmotnosti, dojde k rozdělení jednotlivých alel v rámci gelu a po jejich obarvení je možno detekovat jeden nebo dva bandy (v závislosti na homozygotnosti nebo heterozygotnosti daného jedince). Při nedostatečné optimalizaci PCR reakce však dochází ke vzniku více než jednoho popřípadě dvou bandů.

3.6.3 Problémy hodnocení PCR produktů

Při analýze mikrosatelitů pomocí PCR nastává několik problémů s hodnocením. Patří k nim především *stutter bandy*, nulové alely a homoplazie alel. V souvislosti s problémy při hodnocení lze zmínit také jevy vznikající při nízké koncentraci DNA, jako je *allelic dropout* nebo *mispairing*.

3.6.3.1 *Stutter bandy*

Sklouznutí DNA polymerázy probíhá nejen v živých organizmech, ale také *in vitro* během PCR amplifikace (Miller *et* Yuan, 1997). Produktem tohoto děje jsou tzv. *stutter bandy* neboli *shadow bandy*.

Jedná se o bandy objevující se během elektroforézy PCR produktů a zpravidla jsou kratší o jednu nebo dvě jednotky repetice než hlavní produkt amplifikace (Olejniczak *et* Krzyzosiak, 2006). Bylo prokázáno, že výskyt *stutter* bandů silně koresponduje s délkou základní repetice a celkovou velikostí mikrosatelitové sekvence. Nejčastěji se objevují při analýze mikrosatelitů s krátkou základní repeticí a s velkým počtem repetitivních jednotek a častěji u dinukleotidových repetic než u tri- nebo tetranukleotidových. Omezit produkci *stutter* bandů lze optimalizací PCR podmínek nebo použitím jiných primerů (Miller *et* Yuan, 1997).

Problém *stutter* bandů spočívá ve vytváření souvislých PCR produktů u heterozygotních jedinců (Miller *et* Yuan, 1997). *Stutter bandy* vytvořené z jedné alely totiž spojí tyto dvě alely v jeden souvislý band, čímž často znemožní jejich identifikaci a jedinec je chybně označen jako homozygot.

Kromě kratších *stutter* bandů se může vyskytnout také band delší než je hlavní produkt (Wan *et al.*, 2004). Tento band je výsledkem tendence *Taq* DNA polymerázy přidávat ke 3' konci amplifikované sekvence jeden dATP navíc. Problém nastává, je-li tento jeden nukleotid přidáván nepravidelně a náhodně ne ke všem vznikajícím vláknům DNA.

3.6.3.2 Nulové alely

Jako nulové se označují ty mikrosatelitové alely, které se neamplifikují během PCR (Dakin *et* Avise, 2004). Do dnešního dne byly objeveny v genomu mnoha organismů, jak živočichů tak i rostlin (Chybicki *et* Burczyk, 2009), a zdají se být časté v populacích s velkou efektivní velikostí (Carlsson, 2008).

Jako důvod vzniku nulových alel se nejčastěji uvádí bodová mutace v oblasti nasedání PCR primerů (Dakin *et* Avise, 2004). Druhou možností je rozdílná úroveň amplifikace různě dlouhých alel. Platí, že krátké alely se amplifikují v průběhu PCR efektivněji než dlouhé alely. To má za následek, že u heterozygotního jedince je někdy detekována jen kratší alela. Nulové alely vznikající tímto způsobem se nazývají jako částečné, protože jejich přítomnost lze dokázat zvýšením koncentrace templátové DNA nebo zvýšením kontrastu.

Nulové alely mají za následek snížení heterozygotnosti populace (Chybicki *et* Burczyk, 2009). Na základě tohoto faktu se dají také detekovat. Nevýhodou tohoto postupu je fakt, že zvýšení homozygotnosti populace může být způsobeno také např. inbreedingem. Nulové alely mohou být také zjištěny v rámci kontrolovaného křížení nebo při populačních studiích, kdy mlád'ata zdánlivě nezdědí žádnou alelu od matky.

Výskyt nulových alel má největší význam v populačních studiích, kdy může docházet k falešnému vyloučení skutečných rodičů nebo k přisouzení vlivů inbreedingu přítomnosti nulové alely (Dakin *et* Avise, 2004, Chybicki *et* Burczyk, 2009).

3.6.3.3 Alelová homoplazie

Homoplazické alely jsou takové, které jsou identické svou délkou, ale nejsou identické původem (Estoup *et al.*, 2002, Anmarkrud *et al.*, 2008). Tento stav vzniká v důsledku mutací a je tak přímo spojen s tvorbou nových mikrosatelitových alel.

Rozlišují se dvě formy alelové homoplazie (Anmarkrud *et al.*, 2008). První skupinou jsou alely identické svou délkou, ale ne sekvencí. Tyto alely jsou nerozlišitelné elektroforetickou analýzou, která se zaměřuje na délkovou variabilitu. Lze je však rozlišit na základě sekvenace. Druhou skupinou jsou alely shodné svou délkou i sekvencí, ale které nejsou identické původem a které jsou detekovatelné pouze pomocí již dříve zdokumentovaných mutací.

Výskyt alelové homoplazie závisí na několika faktorech (Estoup *et al.*, 2002). Patří k nim především evoluční faktory jako je mutační rychlost, efektivní velikost populace a doba divergence populací.

Jelikož v současné době převažuje v analýze mikrosatelitů elektroforetická separace nad sekvencováním jednotlivých alel, představuje alelová homoplazie velký problém (Estoup *et al.*, 2002). Může tak ovlivnit výzkum fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy nebo výsledek populačních studií.

3.6.3.4 Problémy spojené s nízkou koncentrací DNA

Jelikož analýza mikrosatelitů je postup založený na PCR, je také závislý na množství a kvalitě použité DNA. V souvislosti s její nízkou kvalitou a nízkou koncentrací se hovoří o dvou základních problémech, kterými jsou *allelic dropout* a *mispairing*.

Jako *allelic dropout* se označuje přednostní amplifikace jedné alely na úkor alely druhé (Wan *et al.*, 2004). Výsledkem je tak chybný genotyp jedince a celkové snížení heterozygotnosti populace. *Mispairing*, také označovaný jako *misprinting* nebo *false alleles*, je jev spojený s vysokým stupněm kontaminace zkoumaného vzorku, kdy dochází k přednostní amplifikaci kontaminantní DNA oproti templátové DNA. K problémům tak dochází při znečištění zkoumaného vzorku DNA příbuzného nebo stejného druhu, například během forezních analýz při identifikaci pachatele.

Oba tyto jevy jsou spojené s biologickým materiálem chudým na DNA, jako jsou vlasy, krev či fekálie (Wan *et al.*, 2004). Mohou být odstraněny zvýšením koncentrace templátové DNA nebo snížením kontaminace vzorku.

3.6.4 Budoucnost analýzy mikrosatelitů

V posledních letech se začínají vyvíjet efektivnější postupy analýzy mikrosatelitů než je elektroforetická separace. Pozornost se obrací k metodám jako je kapilární elektroforéza či *microarray*.

Analýza mikrosatelitů je po sekvencování druhým hlavním využitím kapilární elektroforézy (Wan *et al.*, 2004). Problém někdy nastává při analýze velkých fragmentů DNA, které jsou zpravidla primárním produktem PCR. Objevuje se při ne zcela optimálních elektroforetických podmínkách.

Využití *microarray*, například DNA čipů, při mikrosatelitových studiích je poměrně v začátcích (Wan *et al.*, 2004). Potýká se s potížemi spojenými s délkovým polymorfismem VNTR lokusů vyžadujících vysokou úroveň stringence pro odpovídající kvalitu hybridizace. Tento problém se dá obejít aktivní elektronickou hybridizací. *Microarray* však stále zůstává v pozadí kvůli nedostatečné optimalizaci na analýzu různých mikrosatelitových sekvencí a vysoké finanční náročnosti vzhledem ke klasickým elektroforetickým technikám.

3.7 Mikrosatelity u čeledi konipasovitých

Jediným druhem konipasovitých, u kterého byly hledány mikrosatelity *de novo*, je linduška préríjná (*Anthus spragueii*). Crawford *et al.* (2009) ve své práci uvádějí nalezení 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů (AnSp102-AnSp112) s 5-23 alelami u 19 až 21 jedinců. Původně nalezený polymorfní lokus AnSp101 byl vyřazen z dalšího testování kvůli pravděpodobné vazbě s lokusem AnSp105.

Piertney *et al.* (1998) po izolaci mikrosatelitů u křivky skotské (*Loxia scotica*) provedli *cross-species* studii u příbuzných druhů, která zahrnovala i konipase horského (*Motacilla cinerea*). Z původních osmi lokusů se u něj amplifikovaly 4 lokusy, z nichž LOX8 byl monomorfní a LOX1, LOX2 a LOX6 poskytovaly dvoualelové produkty.

K populačním studiím byly použity mikrosatelity u lindušky kanárské (*A. berthelotii*) (Illera *et al.*, 2007). Jednalo se o 5 párů primerů odvozených od příbuzných druhů, které se ukázaly být u tohoto druhu polymorfní – HrU5 (Primmer *et al.*, 1995), Pca7 (Dawson *et al.*, 2000), Ppi2 (Martínez *et al.*, 1999), LOX8 (Piertney *et al.*, 1998) a Pdo5 (Griffith *et al.*, 1999). Počet alel u daných pěti lokusů se pohyboval v rozmezí 2-62 alel (Illera, osobní sdělení).

Poměrně rozsáhlé studie byly doposud provedeny u lindušky luční (*Anthus pratensis*). Nádvořík *et al.* (2005) otestovali celkem 34 párů primerů od příbuzných druhů pěvců. Tyto mikrosatelitové primery byly testovány na 115 nepříbuzných jedincích pocházejících jednak z českých hor (pohoří Jeseníky a Krkonoše) a z provincie Tydal v centrální části Norska. Vzorky byly odebírány v letech 1998-2002. Nalezli celkem 5 polymorfních lokusů (Mcy μ 4, Ase18, Ase48, HrU5 a LOX8), kdy lokus LOX8 byl nakonec vyloučen z důvodu častého výskytu nulových alel. Čtyři zbývající lokusy vykazovaly u 115 studovaných jedinců 5-16 alel. Nádvořík *et al.* (2008) pak informují o dalších 11 polymorfních lokusech u tohoto druhu nalezených *cross-species* amplifikací 70 mikrosatelitů odvozených od lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*). Jednalo se o lokusy Fhy224, Fhy230, Fhy235, Fhy303, Fhy310, Fhy326, Fhy336, Fhy361, Fhy405 a Fhy407. Všechny lokusy byly testovány na 24 jedincích a vykazovaly 3-17 alel.

4 Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

V této bakalářské práci byla použita DNA celkem pěti druhů z čeledi konipasovitých (Motacillidae): lindušky luční (*Anthus trivialis*), rudokrké (*A. cervinus*) a skalní (*A. petrosus littoralis*) a konipase bílého (*Motacilla alba*) a horského (*M. cinerea*). Tyto druhy byly vybrány na základě momentální dostupnosti a získány od university v Oslu, Norsko.

Vzorky lindušky skalní byly odebrány ve Švédsku v roce 1998, vzorky ostatních druhů v Norsku v letech 1966-2005. Od každého druhu bylo k PCR amplifikaci použito 5 jedinců.

4.2 PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů

Složení PCR mixu pro 5 vzorků:

Deionizovaná voda.....	37,2 µl
Pufr 10x.....	5,6 µl
MgCl ₂ [25 mmol/l].....	3,3 µl
dNTPs [20 mmol/l].....	0,6 µl
primer R.....	2,8 µl
primer F.....	2,8 µl
aTaq DNA polymeráza.....	1 µl

Jednotlivé složky PCR mixu byly vždy po rozmrazení zvortexovány, centrifugovány a poté napipetovány do 1,5 ml mikrozkušavek tak, že Taq DNA polymeráza byla přidána až jako poslední.

Jednotlivé PCR reakce se skládaly z 9 µl PCR mixu a 1 µl DNA o koncentraci 4 - 66 µg/ml. U v pořadí 2. a 5. vzorku DNA lindušky rudokrké byl použit dvojnásobný objem DNA, tedy 2 µl, kvůli špatné amplifikaci při prvním testování. Připravené PCR zkumavky byly vloženy do termocykléru s přednastavenými podmínkami PCR amplifikace.

Časový a teplotní profil PCR reakce:

5 min 94 °C
 35x 30 s 94 °C
 30 s teplota *annealingu*
 30 s 72 °C
 7 min 72 °C

Počáteční teplota *annealingu* byla u lindušky lesní stanovena na 55 °C. Tato hodnota byla postupně snižována na 50 °C v případě konipase lučního a u ostatních druhů na 48 °C kvůli prvotní nízké úspěšnosti amplifikace. V závislosti na produktu reakce byla teplota *annealingu* následně zvýšena nebo snížena.

4.2.1 Mikrosatelitové lokusy testované PCR amplifikací

Ke *cross-species* amplifikaci DNA všech pěti zástupců čeledi konipasovitých bylo použito celkem 33 párů primerů, které byly v minulosti použity ke *cross-species* amplifikaci u zástupců této čeledi nebo od nich byly odvozeny (viz Tab. č. 1)

Tab. č. 1: Mikrosatelitové lokusy použité k amplifikaci DNA testovaných druhů.

V tabulce uveden vždy zdrojový druh, názvy lokusů od něj odvozených včetně *accession number* a jednotky repetice, sekvence primerů a autor a rok publikace.

Zdrojový druh (Autor)	Název lokusu (Acc. No.)	Sekvence primerů (5' → 3')
linduška préríjní (<i>Anthus spraguei</i>) (Crawford <i>et al.</i> , 2009)	AnSp 101 (EU294338)	F: GCAAGAGAGACAGGATAGAGC R: AGTGAAACCTACCAGCAATAACG
	AnSp 102 (EU294339)	F: CACTGCTCTCCTTGGCTG R: GTTAGGCTCCAAGGGTTTGC
	AnSp103 (EU294340)	F: CCAACAGGTATAGCAGGACAC R: AGCAGCTGGAGGATATGTAGG
	AnSp104 (EU294341)	F: AGCAAAGCTGTCTGGGAAG R: CGGTAGGAAGAAATAATGGCAC
	AnSp105 (EU294342)	F: AGCTGGAGAACCAGTCAGC R: CCCTTGGAGAAAGTTCAGTCC
	AnSp 106 (EU294343)	F: TTGTGGTGCATAGAGAGGTC R: CCTTAATGCCTTGTGAGGATTTG
	AnSp 107 (EU294344)	F: CTGGGCAATGAGGTCTCGG R: AGTGCTTCGCAAGGAGAG
	AnSp 108 (EU294345)	F: CACTGGACACCTACTTTTAGTC R: ATGGAGGAGAGGGAGAGGG

Tab. 1: Pokračování.

Zdrojový druh (Autor)	Název lokusu (Acc. No.)	Sekvence primerů (5'→ 3')
línduška préríjní (<i>Anthus spraguei</i>) (Crawford <i>et al.</i> , 2009)	AnSp 109 (EU294346)	F: TGCCAACAGTCTCAAAAGGC R: CCTCCCTCAGTCCACTTTC
	AnSp 110 (EU294347)	F: ACAGGGAGAGGGGAATGC R: TCCTGCCTTACCTGACTGAC
	AnSp 111 (EU294348)	F: CCAGTAGTCACATTCCAGGG R: GCAAAGTCTGCCCTTCTTGAG
	AnSp 112 (EU294349)	F: ACCAACGCAGTGTAGAGAC R: TTCCATCACCCACAACCCC
rákosník seychelský (<i>Acrocephalus sechellensis</i>) (Richardson <i>et al.</i> , 2000)	Ase18 (AJ276375)	F: ATCCAGTCTTCGCAAAGCC R: TGCCCCAGAGGGAAGAAG
	Ase48 (AJ276777)	F: TTTATTTCTGGACTGGAACAATC R: GAACATTGGGCTACTGGGC
lejsek černohlavý (<i>Ficedula hypoleuca</i>) (Leder <i>et al.</i> , 2008)	Fhy224 (EU292767)	F: TACCTCCTGCATTGTCC R: GGCTCTTTCCAGAATCAATC
	Fhy230 (EU292772)	F: GGTTAATCCTGGAGAGTAGAA R: AAAGGTTTGCTGAATATCCAC
	Fhy235 (EU292775)	F: AATGAGTGTAACAGTAGGG R: GTCTATGTAAACCTAAAGC
	Fhy303 (EU292779)	F: CTGGCCTTGCAGTCGGTAA R: CTTTCCTCCACCCCAACTA
	Fhy310 (EU292782)	F: GTTGCTATACACGAGTGGG R: CCAATATTGCAAACCTAACAG
	Fhy326 (EU292784)	F: TCAGATTGTGCTGGTAATG R: CCTAAAGGGAGTATAAGCAAC
	Fhy336 (EU292787)	F: CTATGCAGTAGTCCTATTCAA R: TCAAACAGATCCTAAGTAGAG
	Fhy361 (EU292797)	F: ATGCTGAGCCAAAGTCTGTC R: ATCAGGGAGCTGAGACGAG
	Fhy405 (EU292803)	F: TTGAAAGAGGTGTATTATATGAG R: TCTTTCCAGAATCAATCTATT
	Fhy405 (EU292803)	F: TTGAAAGAGGTGTATTATATGAG R: TCTTTCCAGAATCAATCTATT
	Fhy407 (EU292804)	F: AAAGTTAGCCTATGTCTACCAGA R: TAGCTCTTCCCAGATTCTAAG
vlaštovka obecná (<i>Hirundo rustica</i>) (Primmer <i>et al.</i> , 1995)	HrU5 (X84090)	F: TCAACAAGTGTTCATTAGGTTC R: AACTTAGATAAGGAAGGTATAT
křivka skotská (<i>Loxia scotica</i>) (Pierney <i>et al.</i> , 1998)	LOX1 (Y16820)	F: ATGATGGTAAGTCTAATGAAAGC R: CCACACACATTCCTCTATTG
	LOX2 (Y16821)	F: CAGGCAGAGTGGACATTTATG R: CAGTTTCATGTGGATTTTATG
	LOX6 (Y16823)	F: ACAAATAACATAGGTCAGAAGC R: GCTCTATAACTTTGTGATTTTGC

Tab. 1: Pokračování.

Zdrojový druh (Autor)	Název lokusu (Acc. No.)	Sekvence primerů (5'→ 3')
křivka skotská (<i>Loxia scotica</i>) (Piartney <i>et al.</i> , 1998)	LOX8 (Y16825)	F: TTGTGAAGGTTTGGGACATAAG R: AGTTGAGGCCATTAAAAAGATTC
modroplášník nádherný (<i>Malurus cyaneus</i>) (Double <i>et al.</i> , 1997)	Mcyμ4 (U82388)	F: ATAAGATGACTAAGGTCTCTGGTG R: TAGCAATTGTCTATCATGGTTTG
Sýkora modřinka (<i>Parus cauraleus</i>) (Dawson <i>et al.</i> , 2000)	Pca7 (AJ279809)	F: TGAGCATCGTAGCCCAGCAG R: GGTTTCAGGACACCTGCACAATG
vrabec domácí (<i>Passer domesticus</i>) (Griffith <i>et al.</i> , 1999)	Pdo5 (Y15126)	F: CTGTTTCATTAACTCACAGGT R: AGTGAAACTTTAATCAGTTG
straka obecná (<i>Pica pica</i>) (Martínez <i>et al.</i> , 1999)	Ppi2 (AJ272375)	F: CACAGACCATTTCGAAGCAGA R: GCTCCGATGGTGAATGAAGT

4.3 Analýza PCR produktů

Postup analýzy v 6% polyakrylamidovém gelu o tloušťce 0,4 mm byl optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra.

1. Větší sklo (330 x 420 mm) omýt kartáčkem deionizovanou vodou a otřít do sucha. Plochu, která bude ve styku s gelem, přetřít 96% ethanolem a následně přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů.
2. Menší sklo (330 x 390 mm) omýt vodou a přípravkem na nádobí a důkladně opláchnout deionizovanou vodou. Sklo osušit a v digestoři natřít směsí 1 ml 0,5% kyseliny octové s 3 μl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu na ploše, která bude ve styku s gelem. Po důkladném rozetření nechat 5 minut zaschnout a opláchnout 96% ethanolem a po každém přetření důkladně osušit.
3. Na vodorovnou polystyrenovou podložku položit větší sklo ošetřenou plochou vzhůru, přiložit spacersy o šířce 0,4 mm a na ně umístit menší sklo ošetřenou plochou dolů. Spacersy srovnat tak, aby byly přesně po okraji skel a gumičky přitlačit k hornímu okraji menšího skla. Nakonec na okraji skel v místě spacerů stisknout skla pevně klipsy. Ve výsledku jsou skla v přesném zákrytu, u horního okraje pak posunuta o 2,5 cm.
4. V kádince připravit 6% polyakrylamidový gel smísením 60 ml 6% roztoku akrylamidu, 400 μl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (APS) a 40 μl

N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminu (TEMED). Směs promíchat v kádince a pomalu za neustálého poklepávání rukou na sklo vlévat mezi skla v místě posunutí skel.

5. Po nalití gelu mezi skla vložit hřebínek v místě plnění rovnou stranou směrem mezi skla, a to přibližně 0,7 až 1 cm hluboko. Po kontrole souměrnosti vloženého hřebínku stisknout skla k sobě klipsy. Nechat gel tuhnout přibližně jednu hodinu.
6. Po ztuhnutí gelu odstranit klipsy a skla řádně umýt od zbytků zaschlého gelu. Důkladně osušit gumičky spacerů a kratší sklo papírovým ubrouskem a vložit do elektroforetické komůrky kratším sklem k hliníkové desce komůrky a hřebínkem vzhůru. Sklo pevně uchytit do elektroforetické komůrky.
7. Katodový i anodový prostor elektroforetické komůrky zalít 0,5x TBE pufrem, opatrně vyjmout hřebínek a propláchnout mezeru, která tím vznikla mezi skly, stříkačkou s TBE pufrem. Zavřít oba prostory, připojit elektrody a na zdroji stejnosměrného proudu nastavit limitní výkon na 90 W (hodnoty proudu i elektrického napětí nastavit na maximum, tj. 150 mA a 3000 V). Za těchto podmínek nechat gel nahřát na 48-50 °C, tedy přibližně 30 minut.
8. Pět minut před koncem nahřívání přidat k PCR produktům 5 µl nanášecího pufru a takto připravené vzorky vložit do denaturujících podmínek (94 °C). Po uplynutí 4 minut vzorky vyjmout a umístit do nádoby s ledem.
9. Po nahřátí gelu vypnout zdroj stejnosměrného napětí, odpojit elektrody a propláchnout mezeru mezi skly proudem 0,5x TBE pufru ze stříkačky tak, aby v mezeře nezůstaly žádné nečistoty a bubliny. Do mezery vložit zpět hřebínek zoubky mezi skla přibližně 1 mm hluboko do gelu. Do vzniklých jamek nanášet po 2 µl denaturovaných vzorků.
10. Po nanesení vzorků do jamek připojit elektrody, nastavit na zdroji limitní hodnotu výkonu na 70 W a nechat rozdělávat vzorky požadovanou dobu.
11. Po skončení separace vypustit TBE pufr z katodového prostoru, vyjmout skla a opatrně přemístit na horizontální plochu. Vyjmout spacery a hřebínek a pomocí tupého nože oddělit skla od sebe.
12. Menší sklo s gelem přesunout do fotomisky s fix/stop roztokem gelem vzhůru a nechat promývat minimálně 20 minut. Po uplynutí doby fix/stop roztok slít zpět do baňky a gel třikrát promýt deionizovanou vodou po dobu 1-2 minut.

13. Sklo s gelem vložit na maximálně 5 minut do 1% kyseliny dusičné, poté kyselinu vylít a gel 4x promýt deionizovanou vodou.
14. Gel vložit do 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného, do kterého bylo těsně před použitím přidáno 1,2 ml formaldehydu. Po 30 minutách slít AgNO₃ zpět do nádoby, sklo krátce ponořit do fotomisky s deionizovanou vodou a poté přesunout do prázdné fotomisky.
15. Do předem vychlazeného 3% roztoku uhličitanu sodného (vývojka) přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% thiosíranu sodného, promíchat a vylít do fotomisky s gelem. Po vyvinutí všech bandů přilít k vývojce fix/stop roztok, a to přibližně na 5 minut.
16. Sklo přesunout do fotomisky s deionizovanou vodou a poté osušit v sušárně po dobu 30 minut při 80 °C nebo ve svislé poloze přes noc v laboratoři.
17. Po vyhodnocení gelu sklo ponořit na několik desítek minut až několik hodin do roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l a po odlepení gelu sklo omýt.

4.4 Použité chemikálie

Akrylamid	(Applichem)
aTaq DNA polymeráza (5U/µl), M1241	(Promega)
Bromfenolová modř	(Serva)
dNTPs (100 mmol/l, 400 µl každého), U1240	(Promega)
Deionizovaná voda	
Dusičnan stříbrný	(Lachema)
Ethanol – 96% roztok	(Lihovar Vrbátky)
Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na ₂ EDTA)	(Lachema)
Formaldehyd	(Lachema)
Formamid	(Lachema)
Hydroxid sodný	(Lachema)
Kyselina boritá	(Lachema)
Kyselina dusičná – 65% roztok	(Lachema)
Kyselina octová – ledová	(Lachema)
3-methakryloxypropyltrimethoxysilan	(Serva)
Močovina	(Lachema)
N,N'- methylenbisakrylamid	(Applichem)

N, N, N', N'- tetramethylethyldiamin (TEMED)	(Serva)
Peroxodisíran amonný	(Serva)
Přípravek na odpuzování vody Clear Vue	(Turtle WAX)
Thiosíran sodný	(Lachema)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	(AppliChem)
Uhličitan sodný	(Lachema)
Xylenová modř (Xylencyanol FF)	(AppliChem)

4.5 Použité roztoky

Akrylamid (6% zásobní roztok)

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 50 ml 10 x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N, N'- methylenbisakrylamid 19:1
- po rozpuštění všech složek zfiltrvat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

Dusičnan stříbrný AgNO₃ (0,1% roztok)

- 800 ml deionizované vody
- 0,8 g dusičnanu stříbrného
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Fix/Stop roztok

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

Hydroxid sodný NaOH (1 mol/l) (roztok)

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

Kyselina dusičná HNO₃ (1% roztok)

- 800 ml deionizované vody
- 12 ml 65% kyseliny dusičné

Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu

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

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

1 g peroxodisíranu amonného
- rozpustit v 10 ml deionizované vody

Polyakrylamidový gel (6%)

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

Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu (molekulární lepidlo)

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

TBE pufr (zásobní roztok 10x)

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

Vývojka

800 ml deionizované vody
24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3
- vychladit na teplotu nižší než 10 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

4.6 Vybavení laboratoře

Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150	(Pharmacia)
Elektroforetický zdroj EV232	(Consort)
Chladnička kombinovaná	(Whirlpool)
Laboratorní váhy MARK S 622	(BEL Engineering)
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	(Cleaver Scientific)
Negatoskop NEGA1	(Maneko)
Sekvenační elektroforetická komůrka S2	(Whatman Biometra)
Sušárna HS 122S	(Chirana)
Temperovaný blok Dry-block DB-2D	(Labnet International)
Termocyklér PTC 100-96 VHB	(MJ Research)
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)

[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

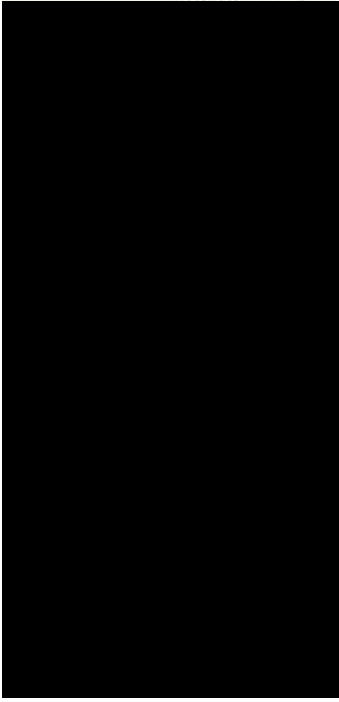
[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

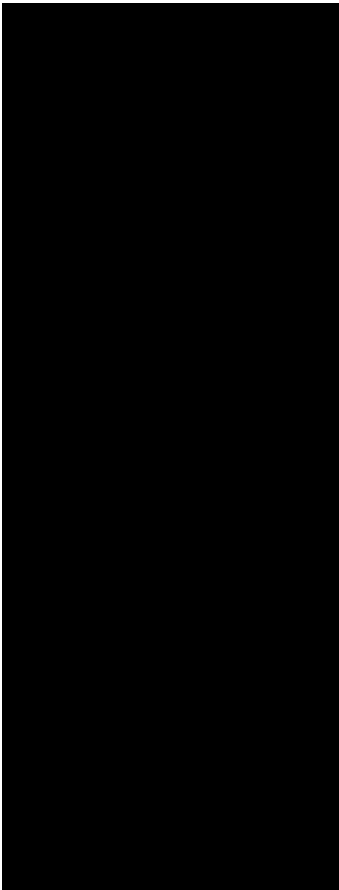
[Redacted text block]

[Redacted text block]

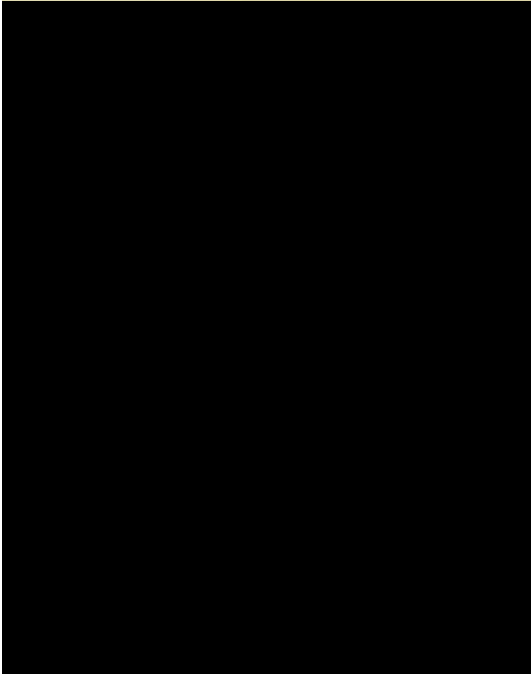


[Redacted text]

[Redacted text]



[Redacted text]



[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

7 Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem hledala pomocí *cross-species* PCR amplifikace polymorfni mikrosatelitové lokusy u pěti druhů konipasovitých, a to u lindušky lesní (*A. trivialis*), rudokrké (*A. cervinus*) a skalní (*A. petrosus littoralis*) a konipase horského (*Motacilla cinerea*) a bílého (*M. alba*).

K nalezení polymorfni lokusů u daných pěti druhů jsem využila celkem 33 párů primerů, které byly odvozeny od příbuzné lindušky préríjní (*A. spragueii*) nebo v minulosti poskytovaly polymorfni PCR produkty u jiných zástupců čeledi konipasovitých. Nalezla jsem celkem 6 mikrosatelitových lokusů, které byly polymorfni u všech pěti zkoumaných druhů. Počet alel se u daných mikrosatelitových lokusů pohyboval v rozmezí 3-9 alel. Tyto lokusy by v budoucnu mohly být využity k populačním studiím jako je testování paternity, studium migrace nebo studium příbuzenského křížení. Na základě polymorfismu v rámci testovaných druhů jsem identifikovala dva lokusy pravděpodobně využitelné k odlišení rodů *Anthus* a *Motacilla*.

Z hlediska počtu polymorfni mikrosatelitových lokusů byla PCR amplifikace nejúspěšnější u lindušky lesní, u které jsem našla 26 polymorfni lokusů z celkových 33 testovaných. Počet alel se pohyboval v rozmezí 3-9 alel u pěti testovaných jedinců. Naopak nejméně polymorfni lokusů jsem pozorovala u lindušky skalní, a to 9 lokusů s 2-9 alelami na lokus.

8 Seznam použitých zkratk

A	adenin
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
C	cytozin
dATP	deoxyriboadenosin trifosfát
dCTP	deoxyribocytidin trifosfát
dGTP	deoxyriboguanidin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	směs deoxyribonukleosid trifosfátů
dTTP	deoxyribothymidin trifosfát
EPC	mimopárová kopulace (<i>Extra-pair copulation</i>)
EPF	mimopárové oplození (<i>Extra-pair fertilization</i>)
EPP	mimopárová paternita (<i>Extra-pair paternity</i>)
EPO	mimopárový potomek (<i>Extra-pair offspring</i>)
G	guanin
kb	kilobáze (<i>kilobase</i>)
LINE	dlouhé rozptýlené repetice (<i>Long interspersed elements</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase chain reaction</i>)
RAPD	polymorfismus náhodně amplifikované DNA (<i>Random amplified polymorphic DNA</i>)
RFLP	polymorfismus délky restikčních fragmentů (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
SINE	krátké rozptýlené repetice (<i>Short interspersed elements</i>)
SSRs	repetice jednoduchých sekvencí (<i>Simple sequence repeats</i>)
STRs	krátké tandemové repetice (<i>Short tandem repeats</i>)
T	thymin
Ta	teplota <i>annealingu</i>
VNTRs	variabilní počet tandemových repetit (<i>Variable number of tandem repeats</i>)

9 Seznam použité literatury

- Albrecht, T., Schnitzer, J., Kreisinger, J., Exnerová, A., Bryja, J., Munclinger, P. (2007): Extrapair paternity and the opportunity for sexual selection in long-distant migratory passerines. *Behavioral Ecology* 18: 477-486.
- Anker-Nilsen, T., Kleven, O., Aarvak, T., Lifjeld, J.T. (2008): No evidence of extra-pair paternity in the Atlantic Puffin *Fratercula arctica*. *Ibis* 150: 619-622.
- Anmarkrud, J.A., Kleven, O., Bachmann, L., Lifjeld (2008): Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evolutionary Biology* 8: 138-148.
- Avilés, J.M., Vikan, J.R., Fossøy, F., Antonov, A., Moksnes, A., Røskaft, E., Shykoff, J.A., Møller, A.P., Jensen, H., Procházka, P., Stokke, B.G. (2011): The common cuckoo *Cuculus canorus* is not locally adapted to its reed warbler *Acrocephalus scirpaceus* host. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 314-325.
- Barrientos, R., Kvist, L., Barbosa, A., Valera, F., López-Iborra, G.M., Moreno, E. (2009): Colonization patterns and genetic structure of peripheral populations of the trumpeter finch (*Bucanetes githagineus*) from Northwest Africa, the Canary Islands and the Iberian Peninsula. *Journal of Biogeography* 36: 210-219.
- Bennett, P. (2000): Demystified... microsatellites. *Molecular Pathology* 53: 177-183.
- Bensch, S., Grahn, M., Müller, N., Gay, L., Åkesson, S. (2009): Genetic, morphological, and feather isotope variation of migratory willow warblers show gradual divergence in a ring. *Molecular Ecology* 18: 3087-3096.
- Bhargava, A., Fuentes, F.F. (2010): Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology* 44: 250-266.
- Boessenkool, S., Taylor, S.S., Tepolt, C.K., Komdeur, J., Jamieson, I.G. (2007): Large mainland populations of South Island robins retain greater genetic diversity than offshore island refuges. *Conservation Genetics* 8: 705-714.
- Bonløkke-Pedersen, J., Drachmann, J., Frydenberg, J., Boomsma, J.J. (2002): Rare extra-pair fertilizations in the semi-colonially breeding linnet *Carduelis cannabina*. *Journal of Avian Biology* 33: 203-206.
- Brooke, M.de L., Welbergen, J.A., Mainwaring, M.C., van der Velde, M., Harts, A.M.F., Komdeur, J., Amos, W. (2010): Widespread translocation from autosomes to sex chromosomes preserves genetic variability in an endangered lark. *Journal of Molecular Evolution* 70: 242-246.
- Brown, T.A. (2007): Klonování genů a analýza DNA. Úvod. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Buschiazzo, E., Gemmell, N.J. (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28: 1040-1050.
- Camfield, A. (2004): Motacillidae. Animal Diversity Web. Navštíveno dne 9. 11. 2010 na <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/>.
- Campbel, N.A., Reece, B.J. (2005): Biology. Pearson Education, Inc., San Francisco.

- Carlsson, J. (2008): Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99: 616-623.
- Clancey, P.A. (1994): Skřivani a konipasové. In: Homolová, Š. (Ed.): Obratlovci: savci, ptáci, obojživelníci, plazi: encyklopedický průvodce světem zvířat. Nakladatelský dům OP, Praha.
- Conrad, K.F., Johnston, P.V., Crossman, C., Kempnaers, B., Robertson, R.J., Wheelwright, N.T., Boag, P.T. (2001): High levels of extra-pair paternity in an isolated, low-density, island population of tree swallows (*Tachycineta bicolor*). *Molecular Ecology* 10: 1301-1308.
- Crawford, N.G., Peters, M.B., Hagen, C., Glenn, T.C., Davis, S.K., Somers, C.M. (2009): Polymorphic microsatellite loci from Sprague's pipit (*Anthus spragueii*), a grassland endemic passerine bird. *Molecular Ecology Resources* 9: 315-317.
- Croteau, E.K., Loughheed, S.C., Krannitz, P.G., Mahony, N.A., Walker, B.L., Boag, P.T. (2007): Genetic population structure of the sagebrush Brewer's sparrow (*Spizella breweri breweri*), in a fragmented landscape at the northern range periphery. *Conservation Genetics* 8: 1453-1463.
- Dakin, E.E., Avise, J.C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.
- Dallimer M., Jones, P.J., Pemberton, M., Cheke, R.A. (2003): Lack of genetic and plumage differentiation in the red-billed quelea (*Quelea quelea*) across a migratory divide in southern Africa. *Molecular Ecology* 12: 345-353.
- 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 sequence homology. *Molecular Ecology* 15: 1299-1320.
- Dawson, D.A., Hanotte, O., Greig, C., Stewart, I.R.K., Burke, T. (2000): Polymorphic microsatellites in the blue tit *Parus caeruleus* and their cross-species utility in 20 songbird families. *Molecular Ecology* 9: 1919-1952.
- Dawson, D.A., Chittock, J., Jehle, R., Whitlock, A., Nogueira, D., Pellatt, J., Birkhead, T., Burke, T. (2005): Identification of 13 polymorphic loci in zebra finch, *Taeniopygia guttata* (Passeridae, Aves). *Molecular Ecology Notes* 5: 298-301.
- Delmore, K.E., Kleven, O., Laskemoen, T., Crowe, S.A., Lifjeld, J.T., Robertson, R.J. (2008): Sex allocation and parental quality in tree swallows. *Behavioral Ecology* 19: 1243-1249.
- Double, M.C., Dawson, D., Burke, T., Cockburn, A. (1997): Finding the fathers in the lest faithful bird: a microsatellite-based genotyping system for the superb fairy-wren *Malurus cyaneus*. *Molecular Ecology* 6: 691-693.
- Double, M.C., Peakall, R., Beck, N.R., Cockburn, A. (2005): Dispersal, philopatry, and infidelity: dissecting local genetic structure in superb fairy-wrens (*Malurus cyaneus*). *Evolution* 59: 625-635.
- Ellegren, H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
- Estep, L.K., Mays, H., Keyser, A.J., Ballentine, B., Hill, G.E. (2005): Effects of breeding density and plumage coloration on mate guarding and cuckoldry in blue grosbeaks (*Passerina caerulea*). *Canadian Journal of Zoology* 83: 1143-1148.

- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J-M. (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591-1604.
- Galbusera, P., Githiru, M., Lens, L., Matthysen, E. (2004): Genetic equilibrium despite habitat fragmentation in an Afrotropical bird. *Molecular Ecology* 13: 1409-1421.
- Galbusera, P., van Dongen, S., Matthysen, E. (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1: 163-168.
- García-Vigón, E., Cordero, P.J., Veiga, J.P. (2008): Cross-amplified polymorphic microsatellites for the spotless starling *Sturnus unicolor*. *Ardeola* 55:3-11.
- Gill, S.A., Vonnhof, M.J., Stutchbury, B.J.M., Morton, E.S., Quinn, J.S. (2005): No evidence for acoustic mate-guarding in duetting buff-breasted wren (*Thryothorus leucotis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 57: 557-565.
- Griffith, S.C., Dawson, D.A., Jensen, H., Ockendon, N., Greig, C., Neumann, K., Burke, T. (2007): Fourteen polymorphic microsatellite loci characterized in the house sparrow *Passer domesticus* (Passeridae, Aves). *Molecular Ecology Notes* 7: 333-336.
- Griffith, S.C., Owens, I.P.F., Thuman, K.A. (2002): Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* 11: 2195-2212.
- Griffith, S.C., Stewart, I.R.K., Dawson, D.A., Owens, I.P.F., Burke, T. (1999): Contrasting levels of extra-pair paternity in mainland and island populations of the house sparrow (*Passer domesticus*): is there an „island effect“? *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 303-316.
- Hanzák, J., Hudec, K. (1974): Světem zvířat, díl II: Ptáci 2. Albatros, Praha.
- Haas, F., Hansson, B. (2008): Identification of 20 polymorphic microsatellite loci in European crow (*Corvus corone*) from existing passerine loci. *Molecular Ecology Resources* 8: 846-850.
- Haavie, J., Saetre, G.-P., Moum, T. (2000): Discrepancies in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumage colour in the pied flycatcher – inferring evolutionary processes. *Molecular Ecology* 9: 1137-1148.
- Hansson, B., Bensch, S., Hasselquist, D., Lilland, B.-G., Wennerberg, von Schantz, T. (2000): increase of genetic variation over time in a recently founded population of great reed warblers (*Acrocephalus arundinaceus*) revealed by microsatellites and DNA fingerprinting. *Molecular Ecology* 9: 1529-1538.
- Hume, R. (2004): Ptáci Evropy. Knižní klub, Praha.
- Hutchinson, J.M.C., Griffith, S.C. (2008): Extra-pair paternity in the Skylark *Alauda arvensis*. *Ibis* 150: 90-97.
- Chybicki, I.J., Burczyk, J. (2009): Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity* 100: 106-113.
- Illera, J.C., Emerson, B.C., Richardson, D.S. (2007): Population history of Berthelot's pipit: colonization, gene flow and morphological divergence in Macaronesia. *Molecular Ecology* 16: 4599-4612.

- Karaiskou, N., Primmer, C. (2009): PCR multiplexing for maximising genetic analysis with limited DNA samples: an example in the collared flycatcher, *Ficedula albicollis*. *Annales Zoologici Fennici* 45: 478-482.
- Karubian, J. (2002): Costs and benefits of variable breeding plumage in the red-backed fairy-wren. *Evolution* 56: 1673-1682.
- Keith, S., Urban, E.K., Frey, C.H. (1992): The birds of Africa, Volume IV. Academic Press Ltd., London.
- Kleven, O., Bjerke, B.-A., Lifjeld, J.T. (2008): Genetic monogamy in the Common Crossbill (*Loxia curvirostra*). *Journal of Ornithology* 149: 651-654.
- Kleven, O., Lifjeld, J.T. (2004): Extrapair paternity and offspring immunocompetence in the reed bunting, *Emberiza schoeniclus*. *Animal Behaviour* 68: 283-289.
- Kleven, O., Øigarden, T., Foyn, B.E., Moksnes, A., Røskaft, E., Rudolfsen, G., Stokke, B.G., Lifjeld, J.T. (2007): Low frequency of extrapair paternity in the common redstart (*Phoenicurus phoenicurus*). *Journal of Ornithology* 148: 373-378.
- Koreth, J., O'Leary, J.J., McGee, J.O'D. (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis. *Journal of Pathology* 178: 239-248.
- Kvist, L., Giralt, D., Valera, F., Hoi, H., Kristin, A., Darchiashvili, G., Lovaszi, P. (2011): Population decline is accompanied by loss of genetic diversity in the Lesser Grey Shrike *Lanius minor*. *Ibis* 153: 98-109.
- Leder, E.H., Kararskou, N., Primmer, C.R. (2008): Seventy new microsatellites for the pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca* and amplification in other passerine birds. *Molecular Ecology Resources* 8: 874-880.
- Lee, J.-W., Jang, B.-S., Dawson, D.A., Burke, T., Hatchwell, B.J. (2009): Fine-scale genetic structure and its consequence in breeding aggregations of a passerine bird. *Molecular Ecology* 18: 2728-2739.
- 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.
- Loiseau, C., Richard, M., Garnier, S., Chastel, O., Julliard, R., Zoorob, R., Sorci, B. (2009): Diversifying selection on MHC class I in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Molecular Ecology* 18: 1331-1340.
- Loyau, A., Schmeller, D.S. (2009): Polymorphic microsatellites identified by cross-species amplifications in the European Coot *Fulica atra*. *Journal of Ornithology* 150: 703-707.
- Magrath, M.J.L., Green, D.J., Komdeur, J. (2002): Sex allocation in the sexually monomorphic fairy martin. *Journal of Avian Biology* 33: 260-268.
- Martínez, J.G., Soler, J.J., Soler, M., Møller, A.P., Burke, T. (1999): Comparative population structure and gene flow of a brood parasite, the great spotted cuckoo (*Clamator glandarius*), and its primary host, the magpie (*Pica pica*). *Evolutions* 53: 269-278.
- Martín-Gálvez, D., Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Burke, T. (2009): Isolation, characterization and chromosome locations of polymorphic black-billed magpie *Pica pica* (Corvidae, AVES) microsatellite loci. *Molecular Ecology Resources* 9: 1506-1512.

- Martín-Gálvez, D., Soller, J.J., Martínez, J.G., Krupa, A.P., Richard, M., Soller, M., Møller, A.P., Burke, T. (2006): A quantitative trait locus for recognition of foreign eggs in the host of a brood parasite. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 543-550.
- Masters, B.S., Johnson, L.S., Johnson, B.G.P., Neely, C.J., Williams, K.L. (2009): „Compatible alleles“ and extra-pair paternity: conclusions depend on the microsatellite loci used. *The Condor* 111: 365-369.
- McInnes, L.M., Dadour, I.R., Stewart, M.E., Ditcham, W.G.F., Mawson, P., Spencer, P.B.S. (2005): Characterization of polymorphic microsatellite markers for the Carnaby's cockatoo (*Calyptorhynchus latirostris*) and related black cockatoo species. *Molecular Ecology Notes* 5: 504-506.
- Melo, M., Hansson, B. (2006): Identification of 15 polymorphic microsatellite loci in the Príncipe seed-eater (*Serinus rufobrunneus*) and assessment of their utility in nine other *Serinus* species (Fringillidae, Aves). *Molecular Ecology Notes* 6: 1266-1268.
- Miller, M.J., Yuan, B.-Z. (1997): Semiautomated resolution of overlapping stutter patterns in genomic microsatellite analysis. *Analytical Biochemistry* 251: 50-56.
- Moore, O.R., Stutchbury, B.J.M., Quinn, J.S. (1999): Extrapair mating system of an asynchronously breeding tropical songbird: the mangrove swallow. *The Auk* 116: 1039-1046.
- Nádvorník, P., Pavel, V., Kučerová, L. et Bureš, S. (2008): 11 DNA microsatellites for the study of paternity in the meadow pipit (*Anthus pratensis*). In: Program a sborník abstrakt - XIX. Biologické dny – Biologický výzkum pro lidské zdraví, Hradec Králové 29. – 31. října 2008. Tribun EU, Brno, 73.
- Nádvorník, P., Uvírová, L., Pavel, V. et 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, S35-S36.
- Neudorf, D.L.H. (2004): Extrapair paternity in birds: understanding variation among species. *The Auk* 121: 302-307.
- Øigarden, T., Borge, T., Lifjeld, J.T. (2010): Extrapair paternity and genetic diversity: the white-throated dipper *Cinclus cinclus*. *Journal of Avian Biology* 41: 248-257.
- Olano-Marin, J., Dawson, D.A., Girg, A., Hansson, B., Ljungqist, M., Kempnaers, B., Mueller, J.C. (2010): A genome-wide set of 106 microsatellite markers for the blue tit (*Cyanistes caeruleus*). *Molecular Ecology Resources* 10: 516-532.
- Oleyniczak, M., Krzyzosiak, W.J. (2006): Genotyping of simple sequence repeats – factors implicated in shadow band generation revisited. *Electrophoresis* 27: 3724-3734.
- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Venkovsky, R., Vieira, M.L.C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.
- Piertney, S.B., Marquiss, M., Summers, R. (1998): Characterization of tetranucleotide microsatellite markers in the Scottish crossbill (*Loxia scotica*). *Molecular Ecology* 7: 1247-1263.
- Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., Lippincott-Schwartz, J. (2007): *Cell Biology*. Saunders/Elsevier, Philadelphia.

- Primmer, C.R., Møller, A.P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.
- Primmer, C.R., Møller, A.P., Ellegren, H. (1995): Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Molecular Ecology* 4: 493-498.
- 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.
- 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.
- Richardson, D.S., Jury, F.L., Dawson, D.A., Salgueiro, P., Komdeur, J., Burke, T. (2000): Fifty Seychelles warbler (*Acrocephalus sechellensis*) microsatellite loci polymorphic in Sylviidae species and their cross-species amplification in other passerine birds. *Molecular Ecology* 9: 2155-2234.
- Saino, N., Primmer, C.G., Ellegren, H., Møller, P. (1997): An experimental study of paternity and tail ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Evolution* 51: 562-570.
- Santure, A.W., Ewen, J.G., Sicard, D., Roff, D.A., Møller, P. (2010): Population structure in the barn swallow, *Hirundo rustica*: a comparison between neutral DNA markers and quantitative traits. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 306-314.
- Segelbacher, G., Kabisch, D., Stauss, M., Tomiuk, J. (2005): Extra-pair young despite strong pair bonds in the European Nuthatch (*Sitta europaea*). *Journal of Ornithology* 146: 99-102.
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Schmoll, T., Schurr, F.M., Winkel, W., Epplen, J.T., Lubjuhn, T. (2007): Polyandry in coal tits *Parus ater*: fitness consequences of putting eggs into multiple genetic baskets. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1115-1125.
- Simeoni, M., Dawson, D.A., Ross, D.J., Châline, N., Burke, T., Hatchwell, B.J. (2007): Characterization of 20 microsatellite loci in the long-tailed tit *Aegithalos caudatus* (Aegithalidae, AVES). *Molecular Ecology Notes* 7: 1319-1322.
- Stewart, I.R.K., Hanschu, R.D., Burke, T., Westneat, D.F. (2006): Tests of ecological, phenotypic, and genetic correlates of extra-pair paternity in the house sparrow. *The Condor* 108: 399-413.
- Stewart, S.L.M., Westneat, D.F., Ritchinson, G. (2010): Extra-pair paternity in eastern bluebirds: effects of manipulated density and natural patterns of breeding synchrony. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64: 463-473.
- Svensson, L., Grant, P.J. (2004): Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého východu: praktická určovací příručka. Nakladatelství Svojtka & Co., Praha.
- Taylor, S.S., Jamieson, I.G. (2007): Factors affecting the survival of founding individuals in translocated New Zealand Saddlebacks *Philesturnus carunculatus*. *Ibis* 149: 783-791.

- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.
- Van Dongen, W.F.D., Munimanda, G.K., Augustin, J., Blomqvist, D., Szép, T., Wagner, R.H. (2010): Identification of novel microsatellite loci in the sand martin, *Riparia riparia*, and cross-amplification of loci from other bird species. *Journal of Ornithology* 151: 761-764.
- Vergnaud, G., Denoeud, F. (2000): Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome research* 10: 899-907.
- Veselovský, Z. (2001): *Obecná ornitologie*. Academia, Praha.
- Voelker, G., Edwards, S.V. (1998): Can weighting improve bushy trees? Models of cytochrome *b* evolution and the molecular systematics of pipits and wagtails (Aves: Motacillidae). *Systematical Biology* 47: 589-603.
- Wan, Q-H., Wu, H., Fujihara, T., Fang, S-G. (2004): Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* 25: 1265-2176.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002): Strategie for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, P. (2004): *Genetické metody v zoologii*. Nakladatelství Karolinum, Praha.