

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Barbora Dvořáková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza polymorfních *cross-species*
mikrosatelitů pro determinaci paternity
u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*)**

Bakalářská práce

Barbora Dvořáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

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 svým kolegům a RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za odborné rady týkající se dané problematiky, cenné připomínky, poskytnutí studijních materiálů, trpělivost a čas, který mi věnovali během psaní mé bakalářské práce.

Práce vznikla za finanční podpory Vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (IGA UPOL) v rámci projektu PrF_2010_052 „Mezidruhová amplifikace polymorfních DNA mikrosatelitů u vodních ptáků“.

Shrnutí

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), které by bylo možno použít pro determinaci paternity u tohoto druhu. Pomocí *cross-species* PCR amplifikace za využití 221 párů primerů, navržených pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitových lokusů izolovaných z druhů ptáků z řádů brodiví (Ciconiiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potáplice (Gaviiformes), tučňáci (Sphenisciformes), veslonozí (Pelecaniformes) a vrubozobí (Anseriformes), jsem našla 27 polymorfních mikrosatelitových lokusů s počtem alel pohybujícím se v rozmezí 2 až 5 alel na lokus. Průměrný počet alel na lokus byl 2,6. Nejúspěšnější byla amplifikace za využití primerů původně navržených pro polymorfní lokusy druhů z řádů veslonozí, plameňáci a brodiví.

Summary

In this bachelor thesis I dealt with the search for polymorphic microsatellite loci of the Pink-baked Pelican (*Pelecanus rufescens*), which could be used for determination of paternity in this species. By *cross-species* amplification technique using primers designed for amplification of polymorphic microsatellite loci isolated from species belonging to Ciconiiformes, Charadriiformes, Phoenicopteriformes, Gaviiformes, Sphenisciformes, Pelecaniformes and Anseriformes, I found 27 polymorphic microsatellite loci. The number of alleles per locus ranged from 2 to 5 with an average of 2,6 alleles per locus. The most successful was amplification using primers designed for amplification of polymorphic microsatellite loci of species from Pelecaniformes, Phoenicopteriformes and Ciconiiformes.

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce	9
3	Současný stav řešené problematiky	10
3.1	Veslonozí	10
3.1.1	Pelikánovití	11
3.1.1.1	Pelikán africký	12
3.2	Mimopárové chování a analýza paternity u ptáků	14
3.2.1	Výhody a nevýhody EPC	15
3.2.2	Analýza paternity u ptáků	15
3.3	Repetitivní sekvence DNA	16
3.3.1	Satelity	17
3.3.2	Minisatelity	18
3.3.3	Mikrosatelity	18
3.3.3.1	Rozšíření jednotlivých typů mikrosatelitových repetice	19
3.3.3.2	Funkce mikrosatelitů	20
3.3.3.3	Evoluce mikrosatelitů a mutační mechanismy	20
3.3.3.4	Zastoupení mikrosatelitů u ptáků	21
3.3.3.5	Analýza mikrosatelitů	22
3.3.3.6	Získávání nových mikrosatelitových lokusů	23
3.3.3.7	<i>Cross-species</i> PCR amplifikace u ptáků	24
3.4	PCR	24
3.4.1	Průběh PCR	25
3.4.2	Analýza PCR produktů	26
3.4.2.1	Problémy analýzy PCR produktů	26
4	Materiál a metody	29
4.1	Biologický materiál	29
4.2	PCR amplifikace mikrosatelitové DNA	29
4.3	Analýza PCR produktů	32
4.4	Použité chemikálie	34
4.5	Použité roztoky	35
4.6	Laboratorní vybavení	37
5	Výsledky	38
6	Diskuze	47
7	Závěr	54
8	Seznam použitých zkratk	55
9	Seznam použité literatury	56

1 Úvod

Mikrosatelity jsou tandemově repetitivní DNA sekvence s jednotkou repeticí o velikosti pohybující se v rozmezí 1-6 bp. Vyskytují se ve všech dosud studovaných eukaryotických a prokaryotických genomech. Díky vysoké rychlosti mutací, jimiž jsou mikrosatelity charakteristické, vykazují vysoký stupeň délkového polymorfismu a staly se proto oblíbenými molekulárními markery v genetických studiích. Pro hledání nových mikrosatelitových lokusů u nově zkoumaných druhů se využívají dvě strategie: izolace mikrosatelitových lokusů *de novo* z genomických knihoven studovaného druhu a *cross-species* PCR amplifikace využívající primery navržené pro amplifikaci mikrosatelitů u blízce příbuzných druhů.

Ve své bakalářské práci se budu zabývat hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů, které by bylo možné použít pro determinaci paternity u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Pomocí *cross-species* PCR amplifikace DNA nepříbuzných jedinců pelikána afrického budu testovat polymorfismus mikrosatelitových lokusů za využití primerů, které amplifikovaly polymorfní mikrosatelitové lokusy u alkounka drobného (*Aethia pygmaea*), čápa bílého (*Ciconia ciconia*), fregatky obecné (*Fregata minor*), ibise japonského (*Nipponia nippon*), kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), kachnice laločnaté (*Bizura lobata*), kajky mořské (*Somateria mollissima*), kolpíka malého (*Platalea minor*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pižmovky velké (*Cairina moschata*), plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*), potáplice lední (*Gavia immer*), tereje červenonohého (*Sula sula*), tereje guánového (*Sula variegata*), tereje modronohého (*Sula nebouxii*), tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adelidae*) a volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*).

2 Cíle práce

- 1) Shromáždit dostupné literární zdroje týkající se mikrosatelitů a jejich užití při studiu ptáků řádů veslonozí (Pelecaniformes), brodiví (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potáplice (Gaviiformes), tučňáci (Sphenisciformes), dlouhokřídlí (Charadriiformes), a vrubozobí (Anseriformes).
- 2) Pomocí *cross-species* PCR amplifikace otestovat mikrosatelity dosud neodzkoušené na druhu pelikán africký (*Pelecanus rufescens*).
- 3) Z těchto vybrat polymorfní mikrosatelity a optimalizovat parametry PCR amplifikace (teplotu *annealingu*) a dobu separace na sekvenační elektroforéze v polyakrylamidovém gelu.
- 4) U nepříbuzných jedinců druhu pelikán africký zjistit počet alel (a jejich konstituci) u každého z nalezených polymorfních mikrosatelitů.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Veslonozí

Řád veslonozí (Pelecaniformes) sestává z šesti čeledí, které zahrnují fregatky (Fregatidae), pelikány (Pelecanidae), anhingy (Anhingidae), tereje (Sulidae), kormorány (Phalacrocoracidae) a faetony (Phaethontidae), někteří autoři přitom ještě rozdělují veslonohé na dva podřády: první zahrnuje čeleď Phaethontidae, druhý pak zbylých pět čeledí (Brown *et al.*, 1993; Nelson, 2005).

Jedná se o nesmírně různorodý řád, jehož někteří zástupci se zdají být stěží navzájem příbuzní (Brown *et al.*, 1993). Mnozí systematičtí biologové jej pokládali za monofyletický, ale na základě výsledků současných studií, založených na výzkumu morfologických vlastností, rozboru DNA a proteinů vaječného bílku (Nelson, 2005), se vědci spíše kloní k názoru, že se jedná o parafyletický či polyfyletický taxon i přesto, že čeledi sdílejí některé charakteristické morfologické i behaviorální znaky (Gaisler *et Zima*, 2007). Podle výsledků molekulárních studií jsou faetoni příbuzní rybákovitým (Sternidae), fregatky jsou spjaty s buňňákovitými (Procellariidae), albatrosovitými (Diomedidae), potáplicovitými (Gaviidae) a tučňákovitými (Spheniscidae) (Hedges *et Sibley*, 1994), kormoráni, anhingy a terejové jsou si navzájem blízce příbuzní a tvoří monofyletickou skupinu (Gaisler *et Zima*, 2007) a pelikáni jsou úzce spřízněni s člunozobcem africkým (*Baleaniceps rex*) a kladivoušem africkým (*Scopus umbretta*) více než se zbytkem veslonohých (Christie, 2002).

Jedinci spadající do tohoto řádu jsou středně až velmi velcí vodní ptáci s veslovací nohou (Laštůvka *et al.*, 1996; Gaisler *et Zima*, 2007). Délka nejmenšího zástupce, faeton žlutozobý (*Phaethon lepturus*), se pohybuje mezi 35 a 40 cm a jeho váha činí asi 460 g. Oproti tomu největší jedinci, pelikán kadeřavý (*Pelecanus crispus*) a pelikán australský (*Pelecanus conspicillatus*), mohou dosahovat délky až 180 cm a hmotnosti 15 kg (Schreiber, 1994). Společným rysem, vyskytujícím se pouze u veslonohých, je plovací blána spojující všechny čtyři prsty (Burnie *et al.*, 2008), přičemž hallux je obrácen dopředu a připojen k vnitřnímu prstu (Nelson, 2005). Také sdílejí stejné umístění přídatných vylučovacích nosních žláz uvnitř očníce a absenci hnízdní nažiny, která se vyskytuje u všech ostatních vodních ptáků (Hedges *et Sibley*, 1994). Mají dlouhý, hluboce rozeklaný zobák (Šťastný *et al.*, 1998), který je u všech druhů, vyjma faetonů, opatřen různě velkým holým hrdelním vakem, nejvíce vyvinutým u pelikánů

a samců fregatek (Schreiber, 1994). Jsou skvělí letci a dobří plavci, ačkoli na souši jim pohyb činí potíže díky posunutí nohou dozadu (Laštůvka *et al.*, 1996; Burnie *et al.*, 2008). Jelikož hlavní složkou jejich stravy jsou ryby, vyskytují se převážně na vodě. V reakci na tento způsob života se u nich vyvinuly různé adaptace jako je např. redukce vnějších nozder (pro zabránění vniknutí vody do nosní dutiny) nebo silně vyvinutá kostrční žláza. U většiny zástupců je kostra silně pneumatizovaná a to i včetně drobných kostí článků prstů, ale u kormoránů a anhing je pneumatizace omezena, vzhledem ke způsobu lovu ryb, jímž je potápění (Šťastný *et al.*, 1998). Pod kůží se jim též rozprostírá rozsáhlý systém vzdušných vaků tvořící měkké polštáře (Schreiber, 1994), který tlumí náraz na hladinu u střemhlav se potápějících druhů a usnadňuje jim vynoření z vody (Burnie *et al.*, 2008).

Veslonozí jsou řádem s kosmopolitním rozšířením, ačkoli nejvíce druhů žije v tropech (Brown *et al.*, 1993). Většina zástupců preferuje mořské prostředí, ale někteří se vyskytují i na vodách brakických či sladkých (Christie, 2002). Pelikáni a kormoráni se dokonce mohou nalézat jak na slané, tak na sladké vodě.

3.1.1 Pelikánovití

Čeď pelikánovití (Pelecanidae) zahrnuje 7, popř. 8, druhů pelikánů: pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*), pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), pelikána australského (*Pelecanus conspicillatus*), pelikána hnědého (*Pelecanus occidentalis*) a pelikána chilského (*Pelecanus thagus*), který je některými autory považován za poddruh pelikána hnědého (Butchart *et al.*, 2009). Nejohroženějším druhem je pelikán kadeřavý, jenž spadá do skupiny „zranitelný“. Pelikán skvrnozobý a pelikán chilský patří mezi druhy řazené do skupiny „téměř ohrožený“.

Pelikáni jsou vodní ptáci, lze je nalézt jak v tropickém, tak v mírném pásu, a vyskytují se na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy. Nežijí v západní Evropě, ve vnitrozemí Jižní Ameriky a v Asii severně od Mongolska (Christie, 2002; Nelson, 2005). Většina druhů je vysoce společenská, tvoří početné kolonie a i v letu se shlukují do velkých hejn (Hanzák *et Hudec*, 1974; Elliot, 1992). Jejich hnízda se nacházejí na zemi, v nízké vegetaci, nebo na stromech (Nelson, 2005) v závislosti na jejich tělesných proporcích. Velké druhy (pelikán bílý, pelikán kadeřavý a pelikán severoamerický)

hnízdí na zemi, tvoří těsné kolonie a mají sklon ke společnému lovu potravy, což je jeden z mála případů koordinované predace u ptáků (Hanzák *et* Hudec, 1974; Elliot, 1992; Šťastný *et al.*, 1998). Menší druhy (pelikán skvrnozobý a pelikán africký) hnízdí na stromech, v rákosí nebo v nízkých keřích, jejich kolonie jsou volnější a loví většinou individuálně. Pelikán hnědý může hnízdit jak na zemi, tak na stromech, a jako jediný zástupce tohoto rodu se pro ryby vrhá střemhlav do vody.

Preferují sladkovodní prostředí velkých jezer, bažin či mokřadů, dočasně zaplavovaných půd či říčních toků, ale mohou se vyskytovat také v brakických vodách lagun a ústí řek do moře, vzácně je lze nalézt i na otevřeném mořském pobřeží (Elliot, 1992; Nelson, 2005). Pelikán hnědý, jediný mořský druh pelikána, hnízdí na suchých skalách, útesech a na stromech, zvláště mangrovech.

Patří mezi jedny z největších a nejtěžších létajících druhů (Brown *et al.*, 1993). Mají nápadně dlouhá a široká na špičkách zakulacená křídla, která umožňují výborné plachtění (Šťastný *et al.*, 1998; Nelson, 2005). Dlouhý krk jim dovoluje mít mohutný zobák položený na hrudi jak během odpočinku, tak za letu (Elliot, 1992). Jedinečná stavba zobáku je pravděpodobně adaptací na lov velkého množství ryb: horní nepohyblivá čelist funguje jako víko, široce roztažitelný vak připojený k flexibilní spodní čelisti slouží jako síto pro sběr ryb z hladiny. Kromě toho je špička zobáku velmi citlivá a umožňuje tak ptákům detekovat ryby i v kalné vodě (Elliot, 1992; Nelson, 2005). Peří pelikánů, s výjimkou pelikána hnědého, je vesměs bílé nebo světle šedé s občasnými růžovými odstíny a černými letkami (Christie, 2002). Navzdory jejich obrovským křídům a lehkým kostem, je většina pelikánů tak těžká, že má značné problémy se vzlétnutím, jenž vyžaduje velké úsilí a docela dost prostoru, pokud jim nepomohou teplé vzdušné proudy, které jsou pro ně esenciální pro let na větší vzdálenosti (Elliot, 1992; Šťastný *et al.*, 1998; Nelson, 2005).

3.1.1.1 Pelikán africký

Systematické zařazení pelikána afrického (*Pelecanus rufescens* Gmelin, 1789) (Christie, 2002; Anonymous, 2010):

říše:	Živočichové (Animalia)
kmen:	Strunatci (Chordata)
podkmen:	Obratlovci (Vertebrata)
třída:	Ptáci (Aves)

podtřída:	Praví ptáci (Ornithurae)
nadřád:	Letci (Neognathae)
řád:	Veslonozí (Pelecaniformes)
podřád:	Pelecani
čeleď:	Pelikánovití (Pelecanidae)
rod:	Pelikán (<i>Pelecanus</i>)

Pelikán africký je druh s velmi širokým rozšířením: vyskytuje se v tropické a subtropické Africe od Senegalu po Etiopii až po jižní Afriku (Elliot, 1992; Butchart *et al.*, 2009). Stejně jako ostatní druhy pelikánů je společenský, hnízdí v malých skupinách i velkých koloniích, často po boku jiných druhů vodních ptáků: čápů, ibisů, volavek a hlavně nesyta afrického (*Mycteria ibis*) a marabu afrického (*Leptoptilos crumeniferus*) (Brown *et al.*, 1993; Nelson, 2005; Butchart *et al.*, 2009). Hnízda se nejčastěji nacházejí ve výšce 10-50 m na vysokých mohutných stromech, vzácně na zemi v rákosí, nízkých keřích podél vody, písčitých ostrovech a mangrovech (Brown *et al.*, 1993; Butchart *et al.*, 2009). Osidluje celou škálu vodních prostředí od sladkovodních jezer a přehradních nádrží po ústí velkých řek do moře, ale preferuje lov v tichých stojatých vodách a vegetací zarostlých mělkých lagunách. Na otevřeném mořském pobřeží se vyskytuje zřídka. Nepatří mezi celosvětově ohrožené druhy, ale velikost jeho populace je těžko určitelná díky hnízdění na stromech a menším společenským tendencím při lovu (Elliot, 1992).

Dospělí jedinci jsou světle šedí s růžovým nádechem na spodní straně těla a černými letkami (Elliot, 1992). Holé části těla (vak, obličej, zobák a nohy) jsou bledého zbarvení, avšak v době hnízdění mají jasné odstíny: vak je vně tmavě žlutý s vertikálními černavými pruhy a uvnitř temně červený, zobák je žlutý, chodidla karmínová, okolo očí se tvoří výrazné skvrny (Nelson, 2005). Délka jejich těla se pohybuje mezi 125-132 cm, hmotnost mezi 3,9-7 kg a rozpětí křídel je zhruba 216-290 cm, samice bývají drobnější než samci (Brown *et al.*, 1993). Mladí jedinci jsou podobní dospělým, ale jsou menší a vrchní strana těla je hnědavá s jemným růžovým odstínem.

Živí se převážně rybami o váze do 450 g, ale většinou loví jednice s hmotností 80-290 g. Jejich nejčastější kořistí jsou tlamovci (*Haplochromis*) a tilápie (*Tilapia*) z čeledi vrubozobcovití (Cichlidae) a ve velkém množství také rybí potěr (Nelson, 2005; Butchart *et al.*, 2009). Denní spotřeba ryb činí přibližně 14 % celkové váhy jedince.

Dávají přednost individuálnímu lovu, přičemž nejaktivnější jsou ráno a večer, ačkoli mohou lovit i za jasných nocí.

Páří se jednou do roka a každý rok se pravděpodobně formují nové páry. Snášejí v průměru jedno až tři vejce, ale většinou přežije a dospěje pouze jedno mládě z jedné snůšky díky velké agresivitě mezi sourozenci (Elliot, 1992; Brown *et al.*, 1993; Nelson, 2005). Mláďata se rodí holá a bezmocná a v prvních týdnech jsou zcela závislá na péči rodičů. Pohlavní dospělosti dosahují ve třech až čtyřech letech.

3.2 Mimopárové chování a analýza paternity u ptáků

Ptačí partnerské vztahy jsou velmi proměnlivé jak délkou trvání, tak typem svazku (Veselovský, 2001). Tato variabilita je zřejmě způsobena různými ekologickými podmínkami, délkou hnízdní doby a potravní nabídkou. U ptáků se lze setkat s monogamií, polygamií (polyandrie, polygynie) i promiskuitou.

Do 80. let 20. století se na základě pozorování chování u ptáků předpokládalo, že většina ptačích druhů je monogamních (Hughes, 1998; Veselovský, 2001). S rozvojem molekulárních metod se však zjistilo, že u velkého množství sociálně monogamních druhů dochází k mimopárovým kopulacím (*Extra-Pair Copulations*, EPC), které mohou vést k mimopárovému oplodnění (*Extra-Pair Fertilizations*, EPF). Tento systém vede k tomu, že samci často věnují svou rodičovskou péči potomkům, kteří nejsou jejich, a že mohou dosahovat reprodukčního úspěchu mimo jejich trvalý partnerský vztah.

Skutečná genetická monogamie byla nalezena u méně než 25 % dosud studovaných sociálně monogamních druhů (Hughes, 1998; Griffith *et al.*, 2002). Mezi ně patří např. pěvuška modrá (*Prunella modulari*), budníček větší (*Phylloscopus trochilus*) nebo buňák šedý (*Calonectris diomedea*). Mezi druhy s mimořádně vysokou mimopárovou paternitou (*Extra-Pair Paternity*, EPP) patří např. strnad rákosní (*Emberiza schoeniclus*), u něhož se EPP vyskytuje přibližně v 55 %, nebo vlaštovka stromová (*Tachycineta bicolor*) s frekvencí EPP asi 41-57 %. Četnost EPP se liší jak mezi druhy, tak i mezi populacemi v rámci jednoho druhu (Petrie *et Kempnaers*, 1998; Griffith *et al.*, 2002). Rozdíly v proporcích EPP mezi druhy a uvnitř druhu pozitivně korelují s množstvím přítomné genetické variability a jsou spojeny s různým stylem života, vzorem péče o mláďata a lokálními možnostmi pro promiskuitu.

Griffith (2000) ve své studii uvádí, že populace žijící na ostrovech vykazují méně častý výskyt EPP než ty žijící na větších pevninských plochách. To naznačuje, že

intenzita sexuální selekce je na ostrovech nižší. Jako možné důvody tohoto chování se uvádějí nízká genetická variabilita ostrovních populací a odlišné životními podmínky. Nízké frekvence EPP lze také očekávat u populací, které nedávno prošly efektem hrdla láhve (Petrie *et* Kempnaers, 1998).

3.2.1 Výhody a nevýhody EPC

Prostřednictvím EPC si samci zvyšují svou zdatnost a rozmnožovací úspěšnost (Veselovský, 2001). Záletný samec však může zároveň ztratit výlučnou paternitu u mláďat, protože během jeho nepřítomnosti může být opuštěná samice oplodněna jiným samcem. Samci si paternitu u potomků proto zajišťují buď hlídáním samice během období, kdy je schopna oplodnění, nebo častou kopulací.

Mezi výhody, které EPC přináší samicím, patří snížení rizika inkubace neoplozených vajec, zvýšení genetické variability potomků a zisk „dobrých genů“ od zdatných samců pro své potomky (Veselovský, 2001). Na druhou stranu ale mohou samice díky příliš častým EPC přijít o vlastního samce.

3.2.2 Analýza paternity u ptáků

Rané studie EPP u ptáků využívaly různé prostředky jako je např. polymorfismus barvy peří, chromozomální polymorfismy nebo polymorfismus alozymů (Griffith *et al.*, 2002; Jones *et* Arden, 2003). Ačkoli každá z těchto metod může být použita pro odhad pravděpodobnosti EPP přítomné nebo nepřítomné v dané populaci, žádná z nich není dostatečně přesná. Polymorfismus opeření není možné použít jako obecný přístup, protože je nápadný jen u několika druhů ptáků. Alozymová variabilita je na druhou stranu mezi druhy velmi častá, ale není dostatečně variabilní mezi jedinci na to, aby poskytla statistickou jistotu pro vyloučení samce jako biologického otce mláďete.

Současné studie EPP u ptáků jsou založeny na analýzách minisatelitových a mikrosatelitových lokusů (Griffith *et al.*, 2002). Představují nejjednodušší a nejpřesnější způsob jak stanovit EPP mezi jedinci, protože pouze pozorování jejich chování může velmi podcenit či přecenit frekvenci EPC (Hughes, 1998). Zavedení mikrosatelitových markerů podstatně zjednodušilo analýzy příbuznosti jedinců (Fridolfsson *et al.*, 1997). Kromě mikrosatelitů a minisatelitů bývají využívány i jiné typy molekulárních markerů jako je např. délkový polymorfismus amplifikovaných

fragmentů (AFLP) nebo uniparentálně děděné cytoplazmatické markery (Jones *et Arden*, 2003).

První identifikované ptačí mikrosatelity byly izolované z vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) a z lejska černočelého (*Ficedula hypoleuca*) a testování příbuznosti jedinců za využití těchto markerů bylo provedeno na mnoha druzích (Fridolfsson *et al.*, 1997). Dědičnost mikrosatelitových alel z rodičů na potomky vykazuje kodominantní mendelistickou dědičnost.

Počet mikrosatelitových lokusů nutných k analýze paternity se liší v závislosti na daném druhu (Double *et al.*, 1997). U druhů, které nejsou filopatrické, poskytuje dostatečné rozlišení pro identifikaci pravého otce s 95% pravděpodobností méně než 5 variabilních lokusů. U druhů filopatrických, např. modroplášťák nádherný (*Malurus cyaneus*), bývá významným problémem analýzy paternity zahrnutí jiných členů rodiny mezi možné otce (Jones *et Arden*, 2003). Největší problém nastává ve chvíli, kdy jsou jako domnělí otcové v analýze omylem zahrnutí i nevlastní sourozenci některých zkoumaných potomků. Menší problém představuje příbuzenství mezi některými domnělými otci. Domnělý otec je vyloučen až ve chvíli, pokud se s potomkem neshoduje ve dvou a více lokusech (Double *et al.*, 1997).

3.3 Repetitivní sekvence DNA

Většina DNA prokaryotního genomu kóduje protein, tRNA nebo rRNA, s malým množstvím nekódující DNA tvořící především regulující sekvence. Na rozdíl od prokaryotních organismů je eukaryotický genom složen převážně z DNA, která nekóduje žádné proteiny ani RNA (Ramel, 1997; Lodish *et al.*, 2000; Campbell *et Reece*, 2007; Pollard *et al.*, 2007). Menší část z ní představuje regulující sekvence a introny, ale většina je organizována do repetitivních sekvencí přítomných v genomu v mnoha kopiích (v některých případech až tisíce kopií stejné sekvence). Mají sklon vykazovat výraznou nestabilitu a dynamiku a jsou tudíž zodpovědné ve velké míře za nestabilitu DNA (Ramel, 1997).

Repetitivní sekvence byly objeveny během reasociačních experimentů, v nichž byla pozorována nestejná reasociace denaturované eukaryotická DNA (Lodish *et al.*, 2000). Část DNA obsahující repetitivní sekvence reasociovala mnohem rychleji než zbytek DNA tvořený sekvencemi jedinečnými.

Existují různé typy repetitivní DNA a několik navrhovaných klasifikačních systémů (Brown, 2002). Obecně vykazuje repetitivní DNA 2 typy distribuce v genomu: rozptýlené repetice a tandemově uspořádané repetice (Pollard *et al.*, 2007).

Rozptýlené repetitivní sekvence se vyskytují roztroušeně po celém genomu (Campbel *et* Reece, 2007). U lidí je většina rozptýlených repetitivních DNA sekvencí tvořena mobilními elementy (malé samostatné DNA elementy rozptýlené v genomu), které jsou nebo byly kdysi schopné se pohybovat z jednoho místa na chromozómu na jiné místo stejného chromozómu, nebo dokonce na jiný chromozóm (Pollard *et al.*, 2007; Snustad *et* Simmons, 2009). Byly objeveny Barbarou McClintock ve 40. letech 20. století při studiu kukuřice a následně byly nalezeny i v dalších organismech (Brown, 2002). Nejznámější rozptýlené repetice u savců jsou krátké rozptýlené repetice SINE (*Short Interspersed Nuclear Elements*), dosahující velikosti asi 300 bp, a dlouhé rozptýlené repetice LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements*), dlouhé zhruba 6 až 7 kb (Brown, 2002; Campbel *et* Reece, 2007; Pollard *et al.*, 2007).

Tandemově repetitivní sekvence představují množství krátkých za sebou jdoucích repetic, přičemž jejich počet na jednom místě v genomu může být až několik stovek tisíc (Campbel *et* Reece, 2007). U savců tvoří asi 10-15 % genomu. Podle velikosti jednotlivých repetitivních jednotek a celkové délky repetice se tandemová repetitivní DNA dělí do 3 podskupin známých jako satelity, minisatelity a mikrosatelity (Bennet, 2000).

3.3.1 Satelity

Prvním objeveným typem tandemově repetitivních sekvencí byla satelitní DNA. Velikost základní jednotky její repetice se pohybuje okolo několika stovek párů bazí a celková velikost repetice může být 100 kb až několik Mbp (Bennet, 2000). Ačkoli jsou některé satelitní DNA roztroušeny na různých místech genomu, většina je lokalizovaná v centromerách, kde mohou hrát strukturní roli, pravděpodobně jako vazebná místa pro jeden nebo více specifických centromerických proteinů (Brown, 2002).

3.3.2 Minisatelity

Minisatelitová DNA je druhým typem tandemové repetitivní DNA. Její velikost se pohybuje od 1 kb do 20 kb s jednotkami repetice dlouhými 10-100 bp (Bennet, 2000; Brown, 2002; Buschiazzo *et* Gemmell, 2006).

Existují dva typy minisatelitové DNA. Prvním typem jsou telomerové sekvence dlouhé zhruba 10-15 kb (Bennet, 2000; Brown, 2002), které chrání chromozómové konce před degradací, umožňují kompletní replikaci telomerických sekvencí a mají pravděpodobně roli v párování chromozómů a buněčném stárnutí (Bennet, 2000). Složení telomerických repetitivních sekvencí je mezi organismy značně rozdílné a telomerová funkce evidentně nevyžaduje specifickou DNA sekvenci (Ramel, 1997).

Kromě telomerových minisatelitů některé eukaryotické genomy obsahují hypervariabilní minisatelity neboli VNTR (*Variable Number Of Tandem Repeats*), z nichž se mnoho, ale ne všechny, nalézají poblíž konců chromozómů (Bennet, 2000; Brown, 2002). Velikost jednotky repetice se pohybuje od 6 bp do 50 bp (Bennet, 2000). VNTR jsou vysoce polymorfní a z toho důvodu jsou využívány pro DNA fingerprinting, ale jejich nerovnoměrná distribuce v genomu je činí relativně slabými genetickými markery. Jejich funkce je doposud nejasná.

Analýza a detekce minisatelitů je založena na digesci DNA restrikčními enzymy a následné hybridizaci restrikčních fragmentů se specifickými DNA sondami komplementárními k repetiční sekvenci (Altukhov *et* Salmenkova, 2002). Využívají se v populační genetice, pro odhad příbuznosti a rodokmenové analýzy, pro studium indukovaných mutačních procesů apod.

3.3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity, také známé jako krátké tandemové repetice (*Single Tandem Repeats*, STR) či repetice jednoduchých sekvencí (*Simple Sequence Repeat*, SSR), jsou vysoce polymorfní tandemově se opakující sekvence složené z jednoduchých sekvenčních motivů dlouhých 1-6 bp (Hancock, 1999; Li *et al.*, 2002; Snustad *et* Simmons, 2009). Byly objeveny ve všech dosud zkoumaných prokaryotických i eukaryotických genomech (Hancock, 1999; Tóth *et al.*, 2000). Jsou roztroušeny víceméně rovnoměrně po celém genomu, ačkoli jejich frekvence v některých oblastech je menší např. v blízkosti telomer nebo v kódujících oblastech.

Jejich pozoruhodné množství a vysoká variabilita vedla k tomu, že byly zvoleny jako vhodné genetické markery a využívají se např. v genetickém mapování při určování příbuzenských vztahů, genetické struktury populací, fylogenetické příbuznosti apod. (Brown, 2004; Buschiazzo *et al.*, 2006; Anmarkrud *et al.*, 2008).

3.3.3.1 Rozšíření jednotlivých typů mikrosatelitových repetic

Z mononukleotidových repetic je v eukaryotických organismech nejvíce rozšířena poly(A)/poly(T) repetice, která ale pro svou vysokou nestabilitu během PCR není vhodná pro mapování genomu nebo populační studie (Hancock, 1999; Tóth *et al.*, 2000). Druhou nejčastější repeticí je poly(C)/poly(G) (Tóth *et al.*, 2000). Mononukleotidové repetice jsou nejběžnější repetice v intronech a mezigenových oblastech primátů a dosahují u nich i největších délek (Li *et al.*, 2002).

U většiny taxonů jsou však v intronech a mezigenových oblastech nejhojněji zastoupeny repetice dinukleotidové (až 48-67%) (Tóth *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002). Nejrozšířenější jsou repetice poly(AC)/poly(GT) a po nich pak poly(AT)/poly(AT) (Tóth *et al.*, 2000). Mezi velmi vzácné repetice ve většině taxonů patří poly(CG)/poly(CG). Obecně se dinukleotidové repetice téměř nevyskytují v exonech.

V exonech převažují trinukleotidové repetice, které zároveň hrají roli i v mnoha neurodegenerativních lidských chorobách (např. syndrom fragilního X, Huntingtonova nemoc) a v některých lidských nádorech (Tóth *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002). Obecně nejhojnější jsou poly(CAG)/(CTG) a poly(AAT)/poly(ATT). Jednou z nejčastějších exonových repetic obratlovců, v intronech se téměř nevyskytující, je poly(CCG)/poly(CGG) (Tóth *et al.*, 2000). Nejméně zastoupené jsou poly(ACG)/poly(CGT) a poly(ACT)/poly(AGT) repetice.

Charakteristickým rysem obratlovcích taxonů je větší množství tetranukleotidových repetic v mezigenových oblastech a intronech než repetic trinukleotidových (Tóth *et al.*, 2000). Tetranukleotidové repetice se téměř nevyskytují v exonech. Mezi nejčastější repetice patří u savců poly(AAAG)/poly(TTTC) a u nesavčích obratlovců poly(AGAT)/poly(ATCA).

Nejběžnějšími pentanukleotidovými repeticemi jsou (A+T) bohaté repetice (např. AAAAT) (Tóth *et al.*, 2000). V exonech se téměř nevyskytují.

Hexanukleotidové repetice jsou druhým nejčastějším typem repetic v exonech (Tóth *et al.*, 2000). Vykazují vysokou variabilitu a jsou relativně (G+C) bohaté.

3.3.3.2 Funkce mikrosatelitů

Prostřednictvím mnoha studií bylo zjištěno, že některé mikrosatelity mohou mít určitý vliv na genom či dokonce v něm zastávat nějaké funkce (Li *et al.*, 2002). Mohou se podílet např. na genové transkripci, translaci, chromatinové organizaci, rekombinaci, DNA replikaci nebo buněčném dělení a některé z nich mohou být příčinou vzniku nemocí. I přesto ve většině konkrétních případů jsou původ a biologické funkce mikrosatelitů zatím neznámé.

3.3.3.3 Evoluce mikrosatelitů a mutační mechanismy

Vznik mikrosatelitů je stále nejasný. Předpokládá se však, že se vytvořily buď *de novo* z jedinečných sekvencí, nebo že jejich tvorbu způsobily transponovatelné elementy SINE a LINE (Buschiazzo *et* Gemmell, 2006).

Mikrosatelity jsou charakteristické rychlou evolucí způsobenou vysokou rychlostí spontánních mutací v porovnání s rychlostí bodových mutací v kódujících oblastech (Altukhov *et* Salmenkova, 2002; Anmarkrud *et al.*, 2008). Odhadovaná rychlost mikrosatelitových mutací v *in vivo* systémech se pohybuje okolo 10^{-2} až 10^{-6} na lokus na generaci (Hancock, 1999; Anmarkrud *et al.*, 2008).

Hlavním faktorem ovlivňujícím mutační rychlost mikrosatelitových lokusů je jejich celková velikost (dlouhé nepřerušené lokusy mutují mnohem častěji než krátké lokusy a z toho důvodu jsou i více polymorfní) a velikost jednotky repetice (dinukleotidové motivy mají vyšší mutační rychlost než trinukleotidové nebo tetranukleotidové motivy) (Hancock, 1999; Li *et al.*, 2002; Buschiazzo *et* Gemmell, 2006). Existuje mnoho dalších faktorů např. pohlaví, GC obsah v okrajových oblastech mikrosatelitů, konkrétní pozice na chromozómu nebo mutace v genech kódujících opravné mechanismy DNA (Li *et al.*, 2002; Anmarkrud *et al.*, 2008).

Nestabilita mikrosatelitů se převážně projevuje jako změny v počtu jejich tandemově uspořádaných repetičních jednotek, což způsobuje délkový polymorfismus mikrosatelitových sekvencí, jenž je hlavním důvodem proč se mikrosatelity staly tak užitečným genetickým nástrojem (Li *et al.*, 2002; Anmarkrud *et al.*, 2008). Největší nestabilitu vykazují GC bohaté trinukleotidy a CA dinukleotidové repetice a jsou variabilnější než ostatní repetitivní sekvence (Ramel, 1997).

Přestože se na evoluci mikrosatelitů mohou podílet i jiné mutační mechanismy, jejich vznik a vysoká nestabilita bývají nejčastěji vysvětlovány prostřednictvím dvou modelů (Tóth *et al.*, 2000; Zima *et al.*, 2004). První zahrnuje sklouznutí nukleotidového řetězce, druhý nerovnoměrný crossing-over (Li *et al.*, 2002).

Sklouznutí nukleotidového řetězce během replikace nebo opravy DNA molekuly je považováno za hlavní mutační mechanismus, kterým mikrosatelity mutují a tvoří nové alely (Levinson *et Gutman*, 1987). Dochází při něm k disociaci DNA řetězců, jejich posunu a následné chybné reasociaci vláken v místě tandemové repetice, což vede ke vzniku vlásenkové struktury a v konečném důsledku ke vzniku inzercí a delecí v DNA vláknech.

Nerovnoměrný crossing-over probíhá mezi DNA molekulami, a to buď mezi sesterskými chromatidami, nebo mezi dvěma různými chromozómy (Levinson *et Gutman*, 1987). Jeho výskyt je tedy omezen pouze na dobu, kdy jsou chromozómy přiloženy k sobě. Způsobuje vznik inzercí a delecí, nejčastěji v dlouhých tandemových repeticích.

Mikrosatelitový růst prostřednictvím mutací není nekonečný (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006). S růstem velikosti lokusu se v něm začínají postupně hromadit přerušování, která mohou být nakonec přímou příčinou zhroucení mikrosatelitového lokusu (Primmer *et Ellegren*, 1998; Buschiazzo *et Gemmell*, 2006). Vznikne směs jedinečných DNA sekvencí, která zahrnuje jen krátké segmenty původního souboru (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006).

3.3.3.4 Zastoupení mikrosatelitů u ptáků

Zastoupení mikrosatelitů v ptačím genomu je v porovnání s jinými genomy obratlovců poměrně nízké (Primmer *et al.*, 1997). Zjištěná hustota mikrosatelitů u ptáků je 1 na každých 20-39 kb, zatímco odhadovaná hustota mikrosatelitů např. v lidském genomu je 1 na každých 6 kb. Byly navrženy dvě hypotézy, které by mohly vysvětlit tento stav:

- První z hypotéz předpokládá, že nedostatek mikrosatelitů v ptačím genomu je důsledkem jeho značné redukce způsobené evolucí létání, což vede k nižšímu podílu nekódující DNA (Primmer *et al.*, 1997). Tuto hypotézu podporuje fakt, že netopýři (jejichž genom patří mezi nejmenší savčí

genomy) mají také redukovanou frekvenci mikrosatelitů. Na druhou stranu Neff *et Gross* (2001) ve své studii zastoupení mikrosatelitů u obratlovců uvádějí, že neobjevili žádný vztah mezi počtem mikrosatelitových lokusů a genomovou velikostí. Z toho vyplývá, že není pravděpodobné, že by redukce genomové velikosti vysvětlovala nedostatek mikrosatelitových lokusů u ptáků.

- Druhá hypotéza se opírá o fakt, že ptačí genom obsahuje menší množství nekódující DNA než většina savců a že ptačí SINE a LINE elementy nekončí poly(A) sekvencemi, které jsou pravděpodobným zdrojem evoluce jednoduchých repetitivních sekvencí u savců (Primmer *et al.*, 1997). Tato hypotéza je podporována výsledky analýzy rostlinných genomů, u nichž je frekvence mikrosatelitů (hlavně AC) mnohem nižší než např. u savců a to jsou některé rostlinné genomy velmi velké, jenže podobně jako ptáci vykazují redukci v evolučních prekurzorech mikrosatelitů (Neff *et Gross*, 2001). Je tedy pravděpodobné, že redukce frekvence mikrosatelitů u ptáků může odrážet rozdíly v množství jejich evolučních prekurzorů.

Nízká hustota mikrosatelitů v ptačím genomu je překážkou pro tvorbu genetických map ptáků a pro lokalizaci genů kvantitativních vlastností.

3.3.3.5 Analýza mikrosatelitů

Mikrosatelitové lokusy se analyzují pomocí PCR za předpokladu, že známe sekvence primerů, komplementárních k jedinečným sekvencím obklopujícím daný lokus (Altukhov *et Salmenkova*, 2002; Zima *et al.*, 2004). Jednotlivé mikrosatelitové alely jsou následně separovány elektroforézou buď v agarózovém, nebo polyakrylamidovém gelu a jejich velikost je určena srovnáním se sadou referenčních DNA fragmentů známé délky.

Mikrosatelitové lokusy jsou identické u blízce příbuzných organismů (např. v rámci druhů stejného rodu), což dovoluje využití stejných primerů a podobných protokolů (Altukhov *et Salmenkova*, 2002). Nicméně, pro analýzu nově zkoumaného druhu bývají zpravidla mikrosatelity izolovány *de novo*.

3.3.3.6 Získávání nových mikrosatelitových lokusů

Hlavní nevýhodou mikrosatelitů je to, že je nutné je izolovat *de novo* z většiny nově studovaných druhů a navrhnout pro ně vhodné PCR primery (Zane *et al.*, 2002; Zima *et al.*, 2004). Je to způsobeno jejich výskytem v nekódujících oblastech genomu, kde je vyšší mutační rychlost (Zane *et al.*, 2002), a dochází tak u nich k akumulaci mutací v jejich okrajových oblastech (Primmer *et al.*, 1996). To znemožňuje PCR amplifikaci mikrosatelitů daného druhu s primery navrženými pro druh vzdáleně příbuzný, jelikož PCR primery vyžadují vysoký stupeň homologie k cílové sekvenci na to, aby mohly fungovat.

Mikrosatelitové lokusy se izolují z genomových knihoven studovaného druhu (Zane *et al.*, 2002). Byly vyvinuty různé metody izolace mikrosatelitů *de novo*, ale všechny představují modifikace původní tradiční metody, která se skládá z:

- fragmentace genomové DNA buď restrikčními enzymy, nebo (méně často) za využití ultrazvukových vibrací
- rozdělení fragmentů DNA podle velikosti a selekce fragmentů o velikosti 300-700 bp
- vložení DNA fragmentů do běžného plasmidového vektoru buď přímo, nebo po navázání na specifické adaptory
- transformace vektoru do bakteriálních buněk
- screening bakteriálních klonů na přítomnost mikrosatelitových sekvencí a selekce pozitivních klonů pomocí hybridizace se značenými sondami obsahujícími repetitivní sekvence (využití dlouhých sond je účinnější než využití krátkých sond) (Ramel, 1997; Zane *et al.*, 2002)
- namnožení a sekvenace pozitivních klonů (Zane *et al.*, 2002)
- navržení specifických primerů a optimalizace PCR podmínek pro umožnění amplifikace daného mikrosatelitového lokusu u různých jedinců populace

U druhů blízce příbuzných je možné pro hledání nových mikrosatelitových lokusů využít tzv. *cross-species* amplifikaci, která zahrnuje využití PCR primerů navržených pro mikrosatelitové lokusy jednoho druhu (zdrojový druh) pro lokalizaci a amplifikaci mikrosatelitových lokusů druhu blízce příbuzného (cílový druh) (Primmer *et al.*, 1996; Zane *et al.*, 2002).

3.3.3.7 *Cross-species* PCR amplifikace u ptáků

Ačkoli neexistují žádné univerzální PCR primery, které by bylo možné použít pro amplifikaci homologních mikrosatelitových lokusů u širokého spektra druhů, je možný jistý stupeň *cross-species* mikrosatelitové amplifikace mezi příbuznými druhy (Primmer *et al.*, 2005). Čím blíže jsou si dané druhy geneticky příbuzné, tím větší je pravděpodobnost úspěšné PCR amplifikace a lokalizace polymorfních mikrosatelitových lokusů (Primmer *et al.*, 1996). S rostoucí fylogenetickou vzdáleností zdrojového a cílového druhu klesá zároveň podíl amplifikovaných polymorfních lokusů i průměrná délka jejich repetice (Primmer *et al.*, 1996; Primmer *et al.*, 2005).

Dalšími faktory ovlivňujícími *cross-species* amplifikaci jsou např. počet jednotek repetice (s rostoucím počtem repetic v lokusu zdrojového druhu roste i polymorfismus lokusu u druhu cílového), teplota hybridizace primerů (jejím snížením se zvyšuje pravděpodobnost amplifikace a lokalizace polymorfních mikrosatelitových lokusů), navržené PCR primery nebo výskyt nulových alel (Primmer *et al.*, 2005).

V současnosti se pro hledání nových mikrosatelitových lokusů stále více užívá *cross-species* amplifikace (Primmer *et al.*, 2005), která je důležitá nejen v populačních studiích individuálních druhů, ale také např. při porovnávání genetické příbuznosti dvou a více druhů navzájem nebo při zkoumání rozdílů uvnitř druhu samotného (Primmer *et al.*, 1996).

3.4 PCR

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) je jednou z nejvýznamnějších technik moderní molekulární biologie. Byla navržena jako metoda pro amplifikaci specifických DNA sekvencí a oblast jejího využití se pohybuje napříč množstvím různých oborů (Stolovitzky *et Cecchi*, 1996). Využívá se např. při sekvencování DNA, identifikaci jedinců nebo v populačních studiích (Zima *et al.*, 2004).

Princip metody PCR spočívá v mnohonásobné selektivní *in vitro* amplifikaci specifických úseků molekuly DNA katalyzované enzymem DNA-polymerázou (Zima *et al.*, 2004; Brown, 2007). Zdrojem templátové DNA mohou být různé biologické materiály např. extrakty z krve či tělní tekutiny (Šmarda *et al.*, 2005). Vysoká citlivost PCR umožňuje i z nepatrného množství DNA namnožit požadovaný úsek a dokonce je

možné s její pomocí získat DNA i z mumifikovaných tkání a pletiv a identifikaci lidských patogenů v archivním materiálu (Persing, 1991; Zima *et al.*, 2004).

Standardní reakční směs pro PCR obsahuje 2 krátké oligonukleotidové primery, 4 deoxyribonukleosid trifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), *Taq* DNA-polymerázu, pufr obsahující MgCl₂ a deionizovanou vodu (Koreth *et al.*, 1996; Zima *et al.*, 2004; Šmarda *et al.*, 2005). Pro zvýšení efektivity PCR se mohou ještě do reakční směsi přidávat různá aditiva např. detergenty, želatina nebo glycerol. Ve většině případů jsou však tyto látky obsaženy již v pufru pro PCR. Koncentrace jednotlivých složek musí být vyvážená, jinak dochází ke vzniku chyb a nespecifických produktů.

3.4.1 Průběh PCR

PCR je cyklický proces, který se skládá ze tří dějů lišících se teplotními nároky: denaturace dvouřetězcových molekul DNA, hybridizace primerů k odděleným řetězcům DNA a syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy.

Při denaturaci se reakční směs zahřeje na 92-95 °C (Zima *et al.*, 2004; Brown, 2007). Tím se rozruší vodíkové můstky mezi vlákny molekuly DNA, což vede k jejich oddělení na jednotlivé řetězce představující templáty pro syntézu nových vláken DNA.

Následným ochlazením reakční směsi dojde k hybridizaci primerů, přítomných ve směsi ve vysoké koncentraci, na specifická místa molekuly DNA (Stolovitzky *et Cecchi*, 1996; Brown, 2007). Teplota hybridizace (teplota *annealingu*, T_a) se pohybuje v rozmezí 30-65 °C a liší se v závislosti na vlastnostech primerů (je nutné ji optimalizovat pro každý primerový pár) (Zima *et al.*, 2004; Šmarda *et al.*, 2005; Brown, 2007). S rostoucí T_a roste i specifičnost primerů ke komplementárním sekvencím na templátu. Příliš vysoká T_a však může znemožnit hybridizaci primerů na templát. Příliš nízká T_a naopak vede k nesprávně spárovaným komplexům primer-templát a vzniku nespecifických produktů.

Zvýšením teploty na 72 °C dojde k aktivaci enzymu *Taq* DNA-polymerázy, který se připojí na 3'-konce primerů a za využití energie dNTP katalyzuje syntézu nových DNA řetězců ve směru od 3'-konce primeru k 5'-konci templátu (Stolovitzky *et Cecchi*, 1996; Zima *et al.*, 2004; Brown, 2007). Tímto krokem je ukončen jeden cyklus PCR. Další cyklus začíná zvýšením teploty a denaturací molekul dvouvláknové DNA, z nichž každá nyní obsahuje 1 vlákno původní templátové molekuly a 1 nově nasyntetizované vlákno DNA.

Počet cyklů denaturace-hybridizace-syntéza je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA (Zima *et al.*, 2004; Brown, 2007). Většinou se pohybuje v rozmezí 20-40 cyklů a vede k syntéze až několika milionů kopií amplifikovaného fragmentu DNA. Konečné produkty PCR jsou fragmenty DNA definované délkou o velikosti obvykle 10 až 10 000 bp a nazývají se amplikony.

3.4.2 Analýza PCR produktů

Nejčastějším prostředkem pro analýzu PCR produktů je elektroforetická separace většinou v polyakrylamidovém (Koreth *et al.*, 1996), případně v agarózovém, gelu (Brown, 2007) a vizualizace vzniklých bandů stříbrem, ethidium bromidem, fluorescenčními barvivy nebo za využití primerů značených fluorescenční značkou (Walsh *et al.*, 1996).

Díky negativnímu náboji nukleových kyselin migrují jejich fragmenty v elektrickém poli směrem k anodě rychlostí závislou na jejich velikosti (kratší fragmenty migrují rychleji) a na velikosti pórů gelu (Zima *et al.*, 2004).

3.4.2.1 Problémy analýzy PCR produktů

Analýzu PCR produktů může zkomplikovat několik faktorů, a to především výskyt *stutter* bandů, nulových alel a homoplazie mikrosatelitových alel.

Stutter bandy

Běžným problémem společným všem detekčním metodám je přítomnost dalších tzv. *stutter* bandů (*shadow bands*, *slippage artifacts*) vedle hlavního mikrosatelitového bandu, lišících se o 1 nebo 2 (Koreth *et al.*, 1996) jednotky repetice. Tyto artefakty vznikají při PCR amplifikaci mikrosatelitových alel díky sklouznutí nukleotidového řetězce nebo selhání DNA-polymerázy během replikace repetičních oblastí (Perlin *et al.*, 1995; Koreth *et al.*, 1996). Relativní podíl každého *stutter* bandu se obecně snižuje s velikostí repetice (Perlin *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 1996).

Stuter bandy jsou časté u mikrosatelitových lokusů s dinukleotidovou jednotkou repetice, v menší míře se objevují i u mikrosatelitových lokusů s trinukleotidovou a tetranukleotidovou jednotkou repetice (Daniels *et al.*, 1998). Kvůli multibandovému

vzoru každé alely je občas interpretace dinukleotidového lokusu komplikovaná, např. když jsou si 2 alely jednoho jedince blízké velikostí (Walsh *et al.*, 1996). Žádné metody, které by úspěšně eliminovaly *stutter* bandy zatím nebyly vyvinuty.

Alelová homoplazie

Homoplazie je jedním z dalších problémů provázejících analýzu mikrosatelitových lokusů (Altukhov *et Salmenkova*, 2002). Jedná se o stav, kdy různé alely jednoho lokusu jsou identické svou velikostí, ale nejsou identické svým původem (Angers *et al.*, 2000; Estoup *et al.*, 2002). Vzniká díky vysoké mutační rychlosti mikrosatelitových lokusů. Prostřednictvím delecí nebo inzercí dochází ke generaci alel o stejné velikosti, jejichž fylogeneze je ovšem odlišná (Altukhov *et Salmenkova*, 2002). Rozlišují se dva typy homoplazie:

- 1) Alely identické svou délkou, ale obsahující odlišné sekvence (Anmarkrud *et al.*, 2008). Pro jejich detekci je třeba osekvenovat každou alelu, protože elektroforetické metody nejsou schopny je rozlišit (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006).
- 2) Alely identické jak svou délkou, tak svými sekvencemi, ale lišící se svým původem (detekovatelné pouze pomocí mutací zdokumentovaných ve známých rodokmenech) (Anmarkrud *et al.*, 2008).

Předpokládalo se, že homoplazie má významný dopad na populační studie např. že vede k redukci počtu pozorovaných alel v populaci, genové diverzity uvnitř i mezi populacemi a pozorovaného podílu heterozygotních jedinců v populaci (Angers *et al.*, 2000). Estoup *et al.* (2002) ale ve své studii uvádějí, že homoplazie pro mnoho typů populačně genetických analýz nepředstavuje velký problém a že vysoký stupeň variability mikrosatelitových lokusů často do velké míry kompenzuje evoluci jejich homoplazie.

Situace, za které by mohla být homoplazie problematická, zahrnuje vysoké mutační rychlosti a velkou populaci s omezenou velikostí alel (Estoup *et al.*, 2002). Také při studiu fylogenetických vztahů mezi populacemi či při studiu populační struktury pomocí analýzy mikrosatelitů může homoplazie působit potíže.

Nulové alely

Nulové alely jsou jakékoli alely na mikrosatelitovém lokusu, které není možno amplifikovat pomocí PCR do takové míry, aby byla možná jejich detekce (Dakin *et* Avise, 2004). Objevují se díky mutacím vznikajícím v jedinečných sekvencích, přiléhajících k mikrosatelitovému lokusu, na které se hybridizují primery (Callen *et al.*, 1993; Altukhov *et* Salmenkova, 2002). Jejich detekce je možná prostřednictvím sekvenace nukleotidových sekvencí okrajových oblastí mikrosatelitů podezřelých na nulové alely (Dakin *et* Avise, 2004). Jednou z možných komplikací způsobených nulovými alelami je potenciální chybné vyloučení biologického rodiče při genetických analýzách biologické maternity a paternity, když jsou potomek i rodič heterozygotní pro nulovou alelu.

K výskytu nulových alel může docházet při použití primerů pro detekci alel u jedinců jiného druhu než pro který byly primery původně navrženy (Dakin *et* Avise, 2004). Alely jiných druhů se mohou mezi sebou do různé míry lišit díky bodovým mutacím, inzercím nebo delecím, které postihují jejich okrajové oblasti. To znesnadňuje nebo i znemožňuje hybridizaci původních primerů a PCR amplifikaci.

Nulové alely se mohou objevovat i díky rozdílné amplifikaci různě velkých alel (Dakin *et* Avise, 2004), která byla pozorována u heterozygotů a je způsobena přednostní amplifikací menších alel. Tento jev se vyskytuje u všech tříd mikrosatelitů a předpokládá se, že je způsoben reasociací větších alel templátu (díky jejich většímu obsahu repetičních jednotek) v průběhu PCR rychleji, než může dojít k jejich replikaci (Daniels *et al.*, 1998). Nulové alely způsobené rozdílnou amplifikací se někdy nazývají „částečně nulové“, protože mohou být často zviditelněny např. přidáním většího množství DNA do reakce (Dakin *et* Avise, 2004).

Vznik nulových alel může být také způsoben selháním PCR následkem nízké kvality templátové DNA nebo jejího nízkého množství (Dakin *et* Avise, 2004). Zatímco některé alely se amplifikují, u jiných amplifikace selhává.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Krev byla odebrána jedincům pocházejícím ze ZOO ve Dvoře Králové z tarzální žíly dolní končetiny injekční stříkačkou. Vzorky krve o objemu 20-100 µl byly odebrány do 2ml zkumavek a smíseny s 1 ml Queen's pufu (Seutin *et al.*, 1991). K izolaci genomické DNA byla použita fenol-chloroformová metoda, jejíž postup byl převzat podle Maniatis *et al.* (1982) a upraven pro materiální a technické podmínky naší laboratoře.

4.2 PCR amplifikace mikrosatelitové DNA

Amplifikací 6 vzorků genomické DNA pelikána afrického, získaných z krve odebrané nepříbuzným jedincům, se testovalo 221 párů primerů navržených pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených od taxonomicky příbuzných i nepříbuzných druhů ptáků (viz Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Testované mikrosatelitové lokusy u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) (Maak *et al.*, 2000; Roeder *et al.*, 2001; Maak *et al.*, 2003; Paulus *et al.*, 2003; Stai *et al.*, 2003; McMillan *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2004; Dawson *et al.*, 2005; Guay *et al.*, 2005; Preston, 2005; He *et al.*, 2006; Dearborn *et al.*, 2008; De Ponte Machado *et al.*, 2008; Faircloth *et al.*, 2009; Fike *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2009; Gernot Segelbacher, osobní sdělení; Shephard *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2009; Geraci *et al.*, 2010; Kapil *et al.*, 2010; Mercer *et al.*, 2010; Morris-Pocock *et al.*, 2010)

Řád, ze kterého zdrojový druh pochází	Zdrojový druh, u něhož byl mikrosatelitový lokus popsán	Název mikrosatelitového lokusu
Brodiví (Ciconiiformes)	Čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)	Cc01, Cc02, Cc03, Cc04, Cc05, Cc06, Cc07, CC1, CC3, CC7, CC9, CC10, CC13
	Kolpík malý (<i>Platalea minor</i>)	PM1-4, PM1-13, PM1-17, PM2-14, PM2-16, PM2-20, PM2-21, PM2-28, PM2-29, PM2-37, PM2-62, PM2-68, PM2-80, PM3-13, PM3-15, PM3-16, PM3-17, PM3-20, PM3-22, PM3-25, PM3-28, PM3-29, PM3-31

Tabulka č. 1: Pokračování

Řád, ze kterého zdrojový druh pochází	Zdrojový druh, u něhož byl mikrosatelitový lokus popsán	Název mikrosatelitového lokusu
Brodiví (Ciconiiformes)	Kvakoš noční (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	nycti14, nycti15, nycti22, nycti26, nycti35, nycti36, nycti41, nycti43, nycti62, nycti68, nycti74
	Ibis japonský (<i>Nipponia nippon</i>)	Nn01, NnEB12
	Volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)	Ae01, Ae04, Ae05, Ae09, Ae13, Ae24, Ae25, Ae26, Ae27, Ae28, Ae30, Ae35, Ae36, Ae37, Ae38, Ae42, Ae44, Ae47
Dlouhokřídlí (Charadriiformes)	Alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	Apy06, Apy07
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák karibský (<i>Phoenicopiterus ruber</i>)	Pruμ4, Pruμ7, Pruμ8, Pruμ9, Pruμ13
	Plameňák růžový (<i>Phoenicopiterus roseus</i>)	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139
Potáplice (Gaviiformes)	Potáplice lední (<i>Gavia immer</i>)	GimA9EPA, GimA12EPA, GimC5EPA, GimC11EPA, GimD9EPA, GimE11EPA, GimD12EPA
Tučňáci (Sphenisciformes)	Tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	AM13
Veslonoží (Pelecaniformes)	Fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	Fmin 01, Fmin 02, Fmin 03, Fmin 04, Fmin 05, Fmin 06, Fmin 07, Fmin 08, Fmin 09, Fmin 10, Fmin 11, Fmin 12, Fmin 13, Fmin 14, Fmin 15, Fmin 16, Fmin 17, Fmin 18
	Kormorán ušatý (<i>Phalacrocorax auritus</i>)	COR 01, COR 03, COR 05, COR 06, COR 07, COR 12, COR 15, COR 17, COR 19, COR 20, COR 21, COR 22, COR 23, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 35, COR 38, COR 41, COR 43, COR 45, COR 47, Dcco-01, Dcco-02, Dcco-03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08
	Pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	PEL190, PEL265

Tabulka č. 1: Pokračování

Řád, ze kterého zdrojový druh pochází	Zdrojový druh, u něhož byl mikrosatelitový lokus popsán	Název mikrosatelitového lokusu
Veslonoží (Pelecaniformes)	Terej červenonohý (<i>Sula sula</i>)	Ss1b-16, Ss1b-51, Ss1b-57, Ss1b-98, Ss1b-106, Ss1b-142, Ss2b-2, Ss2b-35, Ss2b-48, Ss2b-71, Ss2b-88, Ss2b-92, Ss2b-110, Ss2b-138, Ss2b-153
	Terej guánový (<i>Sula variegata</i>)	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-95, Sv2B-152, Sv2B-27
	Terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	BOOB-RM2-F07, BOOB-RM3-D07, BOOB-RM3-F11, BOOB-RM4-A08, BOOB-RM4-B03, BOOB-RM4-C03, BOOB-RM4-D07, BOOB-RM4-E03, BOOB-RM4-E10, BOOB-RM4-F11, BOOB-RM4-G03, Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B-100
Vrubozobí (Anseriformes)	Kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APH07, APH08, APH09, APH12, APH13, APH16
	Kachnice laločnatá (<i>Bizura lobata</i>)	Blm1, Blm10, Blm12
	Kajka mořská (<i>Somateria mollissima</i>)	Smo10
	Pižmovka velká (<i>Cairina moschata</i>)	CmAAT16, CmAAT35, CmAAT38

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

Deionizovaná voda	42,50 µl
Storage Buffer A 10x (50 mmol/l Tris-HCL, pH 8,100 mmol/l NaCl, 0,1 M EDTA, 1 mmol/l DTT, 50% glycerol, 1% Triton X-100).....	6,30 µl
Roztok MgCl ₂ o koncentraci 25 nmol/l	3,75 µl
Roztok dNTPs o koncentraci 20 µmol/l.....	0,65 µl
Primer F o koncentraci 10 µmol/l	3,10 µl
Primer R o koncentraci 10 µmol/l.....	3,10 µl
aTaq DNA polymeráza 5 U/µl.....	0,40 µl

Mikrozkumavky je nutné po napipetování všech složek zvortexovat a zcentrifugovat. Každá reakce se skládá z 9 μ l reakční směsi a 1 μ l roztoku DNA o koncentraci 10-50 μ g/ml. PCR probíhá v termocykleru, přičemž časový a teplotní profil, upravený podle Primmer *et al.* (1996), je následující:

94 °C: 5 min	1 cyklus
94 °C: 30 s	
50 °C: 30 s	35 cyklů
72 °C: 30 s	
72 °C: 7 min	1 cyklus
10 °C: neomezeně	

Výchozí teplota *annealingu* (T_a) byla 50 °C, ale její hodnota byla později měněna (byla snižována nebo zvyšována) v závislosti na výsledcích elektroforetické separace PCR produktů. Volené teploty *annealingu* se pohybovaly v rozmezí 46-64 °C.

4.3 Analýza PCR produktů

PCR produkty byly analyzovány pomocí vertikální elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek a následné vizualizace dusičnanem stříbrným. Postup byl optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 (Whatman Biometra) s rozměry skel 333x418 mm a 333x392 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

Pracovní postup:

- 1) Větší sklo se omyje deionizovanou vodou a osuší se. Strana, která bude v kontaktu s gelem se dvakrát očistí 96% ethanolem a nakonec se ošetří přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů. Sklo se nechá 5 minut odpočívat a poté se omyje deionizovanou vodou.
- 2) Menší sklo se důkladně očistí vodou a saponátem a pak se z obou stran opláchne deionizovanou vodou. Strana, která bude v kontaktu s gelem se po osušení potře roztokem molekulárního lepidla. Sklo se nechá 5 minut odpočívat a poté se čtyřikrát očistí 96% ethanolem.
- 3) Na ošetřený povrch velkého skla se umístí dva spacery těsně k hranám tak, aby nepřechínaly. Menší sklo se ošetřenou stranou opatrně položí na spacery, přičemž jejich guma musí doléhat k hraně skla. Takto poskládaná skla se zajistí pomocí několika klipsů.

- 4) Smícháním 60 ml 6% roztoku akrylamid : N, N'-methylenbisakrylamidu 19:1, 40 μ l N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiaminu a 400 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného se připraví 6% polyakrylamidový gel, který se pomalu vlije do prostoru mezi skly.
- 5) Pod hranu menšího skla se vsune rovnou stranou hřebínek zhruba do hloubky 0,5 cm, zajistí se čtyřmi klipsy a gel se nechá hodinu polymerizovat.
- 6) Po uběhnutí doby nutné ke ztuhnutí gelu se odstraní všechny klipsy, skla s gelem se očistí od zbytků gelu vodou a kartáčem a osušená se přenesou do elektroforetické komůrky, kde se upevní pomocí šroubů.
- 7) Katodový a anodový prostor se zalije 0,5x TBE puftrem, vyjme se hřebínek a prostor, v němž se doposud nacházel, se důkladně pročistí proudem pufru z injekční stříkačky.
- 8) Uzavře se katodový a anodový prostor a komůrka se připojí ke zdroji stejnosměrného proudu, na němž se nastaví výkon na 90 W, elektrický proud na 150 mA a napětí na 3000 V. Za těchto podmínek se skla s gelem nechají půl hodiny nahřívat na teplotu přibližně 50 °C.
- 9) Pět minut před nanášením vzorků se ke vzorkům přidá nanášecí pufr v poměru 2:1 a vloží se do termobloku vytemperovaného na 95 °C, kde se nechají 3 minuty denaturovat. Poté se okamžitě vloží do ledové tříště.
- 10) Elektroforetická komůrka se odpojí od zdroje stejnosměrného elektrického proudu, otevře se katodový prostor a proudem pufru z injekční stříkačky se pročistí mezera pro hřebínek.
- 11) Mezi skla se zasune hřebínek tak, aby zoubky byly asi 1 mm hluboko v gelu.
- 12) Vzorky se nanášejí po 2 μ l pomocí osmikanálové pipety do mezer mezi zoubky.
- 13) Po napipetování všech vzorků se uzavře katodový prostor a elektroforetická komůrka se zapojí do zdroje stejnosměrného elektrického proudu, na němž se nastaví výkon 70 W, elektrický proud 150 mA a napětí 3000 V.
- 14) Během elektroforetické separace se namíchají roztoky potřebné pro vizualizaci separovaných DNA fragmentů, tj. Fix/Stop roztok, roztok 1% kyseliny dusičné, vývojka a 0,1% roztok dusičnanu stříbrného.
- 15) Po skončení elektroforetické separace se elektroforetická komůrka odpojí od zdroje stejnosměrného elektrického proudu, vypustí se pufr z katodové oblasti, povolí se šrouby a skla s gelem se vyjmou.

- 16) Vytáhnou se spacers a hřebínek a pomocí čepele tupého nože se od sebe skla oddělí. Dále se manipuluje pouze s menším sklem, na němž je přilepen gel.
- 17) Sklo s gelem se vloží do Fix/Stop roztoku a přenesse se na třepačku (100 otáček/min), kde se nechá promývat po dobu 20 minut. Poté se roztok slije a uchová se pro pozdější použití.
- 18) Sklo s gelem se čtyřikrát promyje deionizovanou vodou, vloží se do 1% roztoku kyseliny dusičné a přenesse se na třepačku (100 otáček/min).
- 19) Po 5 minutách se roztok kyseliny vylije, sklo s gelem se opět čtyřikrát důkladně promyje a pak se vloží do 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného a přenesse se na 30 minut na třepačku (100 otáček/min). Poté se roztok slije zpět do zásobní lahve a uloží se do lednice.
- 20) Sklo s gelem se na několik vteřin vnoří do deionizované vody a pak se přenesse na třepačku a vloží do vychlazené vývojky (cca 4 °C). Pozoruje se vznik hnědých proužků a ve chvíli, kdy jsou dostatečně viditelné se do vývojky vlije Fix/Stop roztok, čímž se zastaví reakce a zabrání se tak přílišnému ztmavnutí gelu.
- 21) Sklo s gelem se přenesse na několik minut do deionizované vody a poté se nechá usušit za normální teploty nebo se na 1 hodinu vloží do sušárny vyhřáté na 60 °C.
- 22) Gel s vizualizovanými PCR produkty se hodnotí na negatoskopu.
- 23) Sklo s již nepotřebným gelem se vnoří na několik hodin do lázně hydroxidu sodného (1 mol/l), který způsobí odlepení gelu od skla. Gel se vyhodí do toxického odpadu, sklo se důkladně umyje a může se znovu použít.

4.4 Použité chemikálie

Akrylamid	(Serva)
<i>aTaq</i> 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	(Seliko Olomouc)
Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na ₂ EDTA)	(Lachema)
Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA)	(Lachema)

Formaldehyd	(Lachema)
Formamid	(Lachema)
Hydroxid sodný	(Lachema)
Chlorid sodný	(Lachema)
Kyselina boritá	(Lachema)
Kyselina dusičná (65% roztok)	(Lachema)
Kyselina octová (ledová)	(Lachema)
3-methakryloxypropyltrimethoxysilan	(Serva)
Močovina	(Lachema)
N,N'- methylenbisakrylamid	(Serva)
N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED)	(Serva)
Peroxodisíran amonný	(Serva)
Clear Vue - Rain Repellent	
(přípravek odpuzující vodu ze skel automobilů)	(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 zfiltrovat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

Dusičnan stříbrný AgNO₃ (0,1% roztok)

800 ml deionizované vody

0,8 g AgNO₃

- 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% HNO₃

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 (NH₄)₂S₂O₈ (10% roztok)

1 g (NH₄)₂S₂O₈

- rozpustit v 10 ml deionizované vody

- napipetovat po 400 µl do mikrozkušavek a uložit do -20 °C

Polyakrylamidový gel (6%)

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

40 µl N, N, N', N'- tetramethylethyldiaminu

400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈

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 H₃BO₃

40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0

- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Vývojka

800 ml deionizované vody

24 g uhličitanu sodného Na₂CO₃

- vychladit na teplotu nižší než 10 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného Na₂S₂O₃

4.6 Laboratorní vybavení

Elektroforetická komůrka S2	(Whatman Biometra)
Elektroforetický zdroj EV232	(Consort)
Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150	(Pharmacia)
Chladnička kombinovaná	(Whirpool)
Laboratorní váhy EK-200g	(AND)
Magnetická míchačka RCTbasic	(Ika)
Mikropipeta FinnpiPETTE 0,5 až 10 µl (osmikanálová)	(Labsystems)
Mikropipety FinnpiPETTE 0,3 µl až 1 ml	(Labsystems)
Mikropipety NichiPIPET EX 0,5 µl až 1 ml	(Nichiryo)
Minicentrifuga Spectrafuge Mini	(Labnet)
Negatoskop NEGA1	(Maneko)
Sušárna HS 122S	(Chirana)
Termocyklér XP Thermal Cycler	(BIOER technology)
Termocyklér PCT 100-96 VHB	(BIOTECH)
Třepačka Orbit 1900	(Labnet International)
Vortex MS2 Minishaker	(Ika)
Výrobník deionizované a ultračisté vody, typ 02	(AquaOsmotic)
Výrobník ledu Icematic F100 Compact	(Castel Mac)

5 Výsledky

6 Diskuze

7 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) za využití primerů odvozených od fylogeneticky blízce příbuzných druhů ptáků.

Cross-species PCR amplifikací DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického jsem testovala polymorfismus mikrosatelitových lokusů za využití primerů, které amplifikovaly polymorfní lokusy u alkounka drobného (*Aethia pygmaea*), čápa bílého (*Ciconia ciconia*), fregatky obecné (*Fregata minor*), ibise japonského (*Nipponia nippon*), kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), kachnice laločnaté (*Bizura lobata*), kajky mořské (*Somateria mollissima*), kolpíka malého (*Platalea minor*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pižmovky velké (*Cairina moschata*), plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*), potáplice lední (*Gavia immer*), tereje červenonohého (*Sula sula*), tereje guánového (*Sula variegata*), tereje modronohého (*Sula nebouxii*), tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliidae*) a volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*). Z celkového počtu 221 testovaných mikrosatelitových lokusů bylo 27 polymorfních. Průměrná četnost alel byla 2,6. Tyto mikrosatelitové lokusy by mohly být vhodné pro využití v analýzách příbuzenských vztahů mezi jedinci pelikána afrického.

8 Seznam použitých zkratek

A	adenin
AFLP	polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
C	cytozin
dATP	deoxyriboadenosin trifosfát
dCTP	deoxyribocytidin trifosfát
dGTP	deoxyriboguanidin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
dTTP	deoxyribothymidin trifosfát
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
EPC	mimopárová kopulace (<i>Extra-Pair Copulations</i>)
EPF	mimopárové oplození (<i>Extra-Pair Fertilizations</i>)
EPP	mimopárová paternita (<i>Extra-Pair Paternity</i>)
G	guanin
kb	kilobaze
LINE	dlouhé rozptýlené repetice (<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>)
Mbp	mega párů bází
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SINE	krátké rozptýlené repetice (<i>Short Interspersed Nuclear Elements</i>)
SSRs	označení mikrosatelitů (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
STR	označení mikrosatelitů (<i>Single tandem repeats</i>)
T	thymin
T _a	teplota <i>annealingu</i> (<i>Annealing Temperature</i>)
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
U	uracil
VNTR	minisatelity (<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>)

9 Použitá literatura

- Altukhov, Yu.P., Salmenkova, E.A. (2002): DNA Polymorphism in Population Genetics. *The Russian Journal of Genetics* 38: 1173–1195.
- Angers, B., Estoup, A., Jarne, P. (2000): Microsatellite size homoplasy, SSCP, and population structure: a case study in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1926-1932.
- 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.
- Anonymous (2010): Zařazení v systému. Biolib. www.biolib.cz, navštíveno dne 2. 3.2010.
- Bennett, P. (2000): Demystified...microsatellites. *Molecular Pathology* 53: 177-183.
- Brown, L.H., Urban, E. K., Newman, K. (1993): The Birds of Africa, Volume 1. Academic Press, London.
- Brown, T.A. (2002): Genomes. BIOS Scientific Publishers Ltd, Manchester, UK.
- Burnie, D., Hoare, B., DiCostanzo, J. (2008): Ptáci, obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha.
- Buschiazzo, E., Gemmell, N.J. (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28: 1040-1050.
- Butchart, S., Ekstrom, J., Malpas, J. (2009): Species factsheet: *Pelecanus rufescens*. BirdLife International. <http://www.birdlife.org>, navštíveno dne 12. 9. 2009.
- Butchart, S., Ekstrom, J., Malpas, J. (2009): Species factsheet: *Pelecanus thagus*. BirdLife International. <http://www.birdlife.org>, navštíveno dne 12. 9. 2009.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C., Sutherland, G.R. (1993): Incidence and Origin of "Null" Alleles in the (AC)_n Microsatellite Markers. *American Journal of Human Genetics* 52: 922-927.
- Campbel, N.A., Reece, B.J. (2007): Biologie. Computer Press, Brno.
- Dakin, E.E., Avise, J.C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504–509.
- Daniels, J., Holmans, P., Williams, N., Turic, D., McGuffin, P., Plomin, R., Owen, M.J. (1998): A simple method for analyzing microsatellite allele image patterns generated from DNA pools and its application to allelic association studies. *The American Journal of Human Geneticist* 62: 1189-1197.
- Dawson, D.A., Hunter, F.M., Pandhal, J., Buckland, R., Parham, A., Jones, I.L., Bradshaw, M., Jehle, R., Burke, T. (2005): Assessment of 17 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5-15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes* 5: 289-297.
- Dearborn, D.C., Hailer, F., Fleischer, R.C (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* 8: 1399-1401.

- Double, M.C., Cockburn, A., Barry, S.C., Smouse, P.E. (1997): Exclusion probabilities for single-locus paternity analysis when related males compete for matings. *Molecular Ecology* 6: 1155-1166.
- 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.
- Faircloth, B.C., Ramos, A., Drummond, H., Gowaty, P.A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *Conservation Genetics Resources* 1: 159-162.
- Fike, J.A., Devault, T.L., Rhodes, O.E. (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* 9: 1183-1185.
- Fridolfsson, A.-K., Gyllensten, U.B., Jakobsson, S. (1997): Microsatellite markers for paternity testing in the Willow warbler *Phylloscopus trochilus*: high frequency of extra-pair young in an island population. *Hereditas* 126: 127-132.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): Zoologie obratlovců. Academia, Praha.
- Geraci, J., Gaillard, M., Bechet, A., Cezilly, F., Wattier, R.A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, **preprint**.
- Griffith, S.C. (2000): High fidelity on islands: a comparative study of extrapair paternity in passerine birds. *Behavioral Ecology* 11: 265-273.
- 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.
- Guay, P.J., Mulder, R.A. (2005): Isolation and characterization of microsatellite markers in musk duck (*Biziura lobata*: Aves), and their application to other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 5: 249-252.
- Hackett, S.H., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W, Witt, C.C, Yuri, T. (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* 320: 1763-1768.
- Hancock, J. (1999): Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D.B., Schlötterer, C. (Eds.): Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, Oxford, England.
- Hanzák, J., Hudec, K. (1974): Světem zvířat, díl 2, část 1., Ptáci. Albatros, Praha.
- He, L.P., Wan, Q.H., Fang, S.G., Xi, Y.M. (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered crested ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics* 7: 157-160.
- Hedges, S.B., Sibley, C.G. (1994): Molecule vs. morphology in avian evolution: The case of the “pelecaniform” birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 9861–9865.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. (1992): Handbook of the Birds of the World, Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona.

- Huang, X., Zhou, X., Chen, M., Fang, W., Chen, X. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics*, **in press**.
- Hughes, C. (1998): Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. *Ecology* 79: 338-339.
- Chang, Q., Xie, Z., Li, Q., Zhou, K. (2009): Microsatellite loci developed for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservation Genetics* 10: 1537-1539.
- Christie, J.R. (2002): Pelecaniformes, Pelicans (*Pelecanidae*). In: Hutchins, M., Jackson, J.A., Bock, V.J., Olendorf, D. (Eds.). *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*, 2nd edition. Volume 8. Birds I. Gale Cengage, Michigan. USA.
- Ji, Y.-J., Liu, Y.-D., Ding, C.-Q., Zhang, D.-X. (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4: 615-617.
- Jones, A.G., Arden, W.R. (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12: 2511-2523.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. (2007): Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- Kapil, R., Sawyer, G.M., Preston, L., Benjamin, R.C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). **preprint**.
- Koreth, J., O'Leary, J.J., McGee, J.O'D. (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis *The Journal of Pathology* 178: 239-248.
- Laštůvka, Z., Gaisler, J., Krejčová, P., Pelikán, J. (1996): *Zoologie pro zemědělce a lesníky*. Nakladatelství KONVOJ, Brno.
- Levinson, G., Gutman, G.A. (1987): Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4: 203-221.
- Li, Y.-C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-65.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000): *Molecular cell biology*. W H Freeman & Co, USA.
- Maak S, Neumann K, von Lengerken G, Gattermann R (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics* 3: 233.
- Maak S, Wimmers K, Weigend S, Neumann K (2003): Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 3: 224-227.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Mayr, G. (2007): Avian higher-level phylogeny: well-supported clades and what we can learn from a phylogenetic analysis of 2954 morphological characters. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46: 63-72.
- McMillan, A.M., Bagley, M.J., Evers, D.C. (2004): Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). *Molecular Ecology Notes* 4: 297-299.
- Mercer, D.M, Haig, S.M., Mullins, T.D. (2010): Isolation of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources*, **in press**.
- Morris-Pocock, J.A, Taylor, S.A., Sun, Z., Friensen, V.L. (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources*, **preprint**.
- Nádvořník P., Drobek A., Čihák K.: (2008) Microsatellite markers for the study of paternity in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*) and Caribbean Flamingo (*P. ruber*). *Journal of Agrobiology* 25: 93-96.
- Neff, B.D., Gross, M.R. (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55: 1717-1733.
- Nelson, B.J. (2005): Pelicans, Cormorants, and their Relatives. The Pelecaniformes. Oxford University Press, Oxford.
- Ogilvie, M. (2002): Phoenicopteriformes. In: Hutchins, M., Jackson, J.A., Bock, V.J., Olendorf, D. (Eds.). Grzimek's Animal Life Encyclopedia, 2nd edition. Volume 8. Birds I. Gale Cengage, Michigan. USA.
- Paulus, K.B., Tiedemann, R. (2003): Ten polymorphic autosomal microsatellite loci for the Eider duck *Somateria mollissima* and their cross-species applicability among waterfowl species (Anatidae). *Molecular Ecology Notes* 3: 250–252.
- Perlin, M.W., Lancia, G., Ng, S-K. (1995): Toward fully automated genotyping: Genotyping microsatellite markers by deconvolution. *American Journal of Human Genetics* 57: 1199-1210.
- Persing, D.H. (1991): Polymerase chain reaction: trenches to benches. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 1281–1285.
- Petrie, M., Kempnaers, B. (1998): Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 52-58.
- Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., Lippincott-Schwartz, J. (2007): Cell Biology. Saunders/Elsevier, Philadelphia.
- De Ponte Machado, M., Feldheim, K.A., Sellas, A.B., Bowie, R.C.K. (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics* 10: 1033-1036.
- Preston, E.L. (2005): Isolation and Characterization of Polymorphic Loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New Tools for Wildlife Management. Thesis (Ph. D.). University of North Texas.
- Primmer, C.G., 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., Raudsepp, T., Chowdhary, B.P., Moller, A.P., Ellegren, H. (1997): Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* 7: 471-482.
- Primmer, C.R., Ellegren, H. (1998) Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution* 15: 997-1008.
- 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.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995): GenePop (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Roeder, A.D., Marshall, R.K., Mitchelson, A. J., Visagathilagar, T., Ritchie, P.A., Love, D.R., Pakai, T.J., McPartlan, H.C., Murray, N.D., Robinson, N.A., Kerry, K.R., Lambert, D.M. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology* 10: 1645-1656.
- Seutin, G., White, B.N., Boag, P.T. (1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69: 82-90.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009): Genetika. Vydavatelství MU, Brno.
- Shephard, J.M., Galbusera, P., Hellemans, B., Jusic, A., Akhandaf, Y. (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics* 10: 1525-1528.
- Schreiber, E.A. (1994): Pelikáni a jejich příbuzní. In: Homolová, Š. (Ed.): Obratlovci: savci, ptáci, obojživelníci, plazi: encyklopedický průvodce světem zvířat. Nakladatelský dům OP, Praha.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V. (2005): Metody molekulární biologie. Vydavatelství MU, Brno.
- Stai, S.M., Hughes, C.R. (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics* 5: 387-389.
- Stolovitzky, G., Cecchi, G. (1996): Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 12947-12952.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): Svět zvířat IV – Ptáci (1). Albatros, Praha.
- Taylor, S.A., Morris-Pocock, J.A., Sun, Z., Friesen, V.L. (2009): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology*, **in press**.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-81.
- Veselovský, Z. (2001): Obecná ornitologie. Academia, Praha.
- Yeung, C.K.L., Hsu, Y.-C., Yao, C.-T., Li, S.-H. (2009): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics* 10: 1081-1084.

- Walsh, P.S., Fildes, 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., Paternello, 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.