

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza a charakteristika polymorfních
cross-species mikrosatelitů pro determinaci paternity
u slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*)**

Diplomová práce

Eva Jiskrová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho čas a odborné rady, které mi poskytl při vzniku této práce.

SOUHRN

Genetické markery jsou v současné době asi nejpoužívanějšími nástroji při charakteristice jednotlivců i populací. Mezi takové markery patří i mikrosatelity.

V teoretické části diplomové práce jsem se zabývala popisem mikrosatelitů a jejich využitím, *cross-species* amplifikací a využitím pohlavně vázaných markerů při determinaci pohlaví ptáků. Do teoretické části jsem také zahrнула charakteristiku slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) a věnovala jsem se přehledu vědeckých studií, které se zabývaly rodem *Luscinia* a ve kterých byly použity genetické markery.

V praktické části práce jsem se zaměřila na testování a charakteristiku *cross-species* mikrosatelitů u slavíka obecného. Vyzkoušela jsem celkem 71 mikrosatelitových lokusů popsaných u blízce příbuzných druhů, z nichž 32 poskytovalo polymorfní produkt a bylo možné je genotypovat na 24 jedincích a charakterizovat pomocí statistického programu Cervus 3.0.3. Čtyři lokusy byly vázané na pohlaví, konkrétně na chromozom Z. Nakonec jsem vybrala 4 polymorfní *cross-species* lokusy, které by byly vhodné pro analýzu paternity u slavíka obecného.

SUMMARY

Genetic markers are the most used tools for a characteristic of individuals or populations in recent years. Microsatellites belong to these markers.

In the theoretical part of my diploma thesis, I was concerned with a description and utilisation of microsatellites, cross-species amplification, and with a usage of sex-linked loci for a determination of the avian sex. I also added the nightingale description and summary of scientific studies dealt with *Luscinia* spp. and genetic markers in the theory.

In the practical part, I focused on a testing and characterization of cross-species microsatellites in the nightingale. In the sum, I tested 71 microsatellite loci described in closely related species. 32 microsatellites amplified the polymorphic product and I could genotyping them in 24 individuals and characterized them by the statistical program Cervus 3.0.3. Four loci were sex-linked on the Z chromosome. At the end, I chose 4 polymorphic cross-species loci, which could be useful in the paternity analysis in the nightingale.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	CÍLE PRÁCE	8
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
3.1	Molekulární markery	9
3.1.1	Mikrosatelity	9
3.1.1.1	Vlastnosti mikrosatelitů	10
3.1.1.2	Detekce mikrosatelitových lokusů.....	10
3.1.1.3	Využití mikrosatelitů	11
3.1.1.4	Orthologní mikrosatelity.....	13
3.2	<i>Cross-species</i> amplifikace mikrosatelitů	13
3.2.1	Faktory ovlivňující <i>cross-species</i> amplifikaci	13
3.3	Determinace pohlaví u třídy AVES.....	14
3.3.1	Pohlavní chromozomy	14
3.3.2	Metody pro určení pohlaví u ptáků.....	15
3.3.2.1	Pohlavně vázané geny.....	15
3.3.2.2	Méně používané metody determinace pohlaví	15
3.3.2.3	Determinace pohlaví pomocí mikrosatelitů.....	16
3.4	Slavík obecný.....	18
3.4.1	Charakteristika druhu.....	18
3.4.2	Studium rodu <i>Luscinia</i>	19
4	MATERIÁL A METODIKA	22
4.1	Vzorky DNA.....	22
4.2	Izolace DNA z krve	22
4.3	PCR reakce	23
4.4	Gelová elektroforéza.....	24
4.4.1	Příprava skel a PAA gelu.....	24
4.4.2	Elektroforéza.....	25
4.5	Barvení produktů PCR v gelu	25
4.6	Chemikálie	26
4.7	Roztoky	27
4.8	Přístrojové vybavení laboratoře	29
5	VÝSLEDKY	31
6	DISKUZE	45
7	ZÁVĚR	53
8	SEZNAM LITERATURY.....	54
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	61
10	PŘÍLOHY	62

1 ÚVOD

Studium populací je založeno nejen na terénním pozorování, ale i na genetických datech. Genetické markery jsou jedny z nejdůležitějších nástrojů k určení variability nebo naopak uniformity uvnitř i mezi populacemi. Etologie ptačích populací je v posledních cca 20 letech popisována na základě četnosti mimopárového oplození a výskytu mimopárových mláďat. Stanovování paternity se dříve provádělo pomocí DNA fingerprintingu, v současné době se ale od něj upouští. DNA fingerprinting nahradily mikrosatelity, s jejichž pomocí lze snadněji určit, zda jsou dva zkoumaní jedinci příbuzní či nikoliv. Jedná se o krátké tandemové repetice, které mají délku repetičního motivu do 10 nukleotidů a počet opakování 10x až 50x. Vlastnosti mikrosatelitů, jako je kodominance alel, přenos do potomstva podle mendelistických pravidel nebo vysoká variabilita, reprodukovatelnost a snadnost detekce, z nich dělají ideální markery pro studování genetiky populací.

Mikrosatelitové lokusy lze dále využít při studiu migrace a genového toku, diverzity populací a částečně i pro odhadování fylogenetické vzdálenosti. Další využití našly mikrosatelity v genomice jako kotvící markery při mapování genů nebo určovací markery při analýzách hybridů.

Vývoj nových mikrosatelitových lokusů je finančně i časově náročný, proto se často využívá *cross-species* amplifikace. Jedná se o testování, zda mikrosatelit odvozený z jednoho druhu poskytne u jiného druhu polymorfní PCR produkt.

Tato práce se bude zabývat charakterizací *cross-species* mikrosatelitů, které by bylo možné použít v populačních studiích, zvláště při analýzách paternity, u slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*).

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Genotypování polymorfních lokusů získaných v předchozí bakalářské práci u dostatečného počtu jedinců slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) pro získání jejich charakteristik.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 MOLEKULÁRNÍ MARKERY

Při popisu variability v rámci populace už nestačí pouze porovnání fenotypických znaků. Pokud chceme rozlišit dva jedince na molekulární úrovni, je třeba použít molekulární markery. V mnoha vědních oborech se využívají jak fenotypové znaky, které slouží jako užší kritérium výběru, tak molekulární markery, které se k danému fenotypovému znaku váží a pomocí nichž se popisují konkrétní odlišnosti v sekvenci DNA.

Mezi genetické markery lze zařadit specifické sekvence DNA, které vznikají při technikách RAPD, RFLP nebo AFLP, dále SNPs markery založené na konkrétních změnách v nukleotidové sekvenci nebo satelitní oblasti DNA. Mezi molekulární markery patří také mikrosatelity.

3.1.1 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou v současnosti asi nejvíce využívané DNA markery. Jedná se o krátké tandemové repetice o dvou až deseti nukleotidech, jejichž repetiční jednotky vytvářejí souvislé sekvence o 10 až 50 opakování (Ellegren, 1992; Bruford & Wayne, 1993). V literatuře je možné setkat se i s označením SSRs (simple sequence repeats) nebo STRs (simple tandem repeats).

Jako jedni z prvních popsali mikrosatelity Hamada *et al.* (1982, 1984), kdy zjišťovali množství a rozmístění $(TG)_n$ repetic u zástupců vyšších organismů a vliv těchto motivů na Z-konformaci DNA. Následně bylo zjištěno, že jsou mikrosatelity náhodně rozmístěny v genomech všech eukaryot, převážně v nekódujících sekvencích nebo v intronových oblastech, dokonce se vyskytují i v chloroplastové a mitochondriální DNA (Tautz, 1989; Ellegren, 1992; Lagercrantz *et al.*, 1993; Neff & Gross, 2001; Kalia *et al.*, 2010). V genomu člověka se mikrosatelitový motiv nachází v průměru každých 6 kb (Beckmann & Weber, 1992). Ptačím genom má průměrnou velikost 1,2 Gb (Tiersch & Wachtel, 1991), tzn. že je asi 3x menší než lidský. Oproti ostatním obratlovcům je frekvence výskytu mikrosatelitových sekvencí v ptačím genomu značně nižší, repetitivní motiv lze najít zhruba každých 39 kb (Primmer *et al.*, 1997). Mikrosatelitové sekvence se převážně vyskytují v oblasti centromer a telomer

a na pohlavních chromozomech. V kódujících oblastech se vyskytují téměř výlučně jen třínukleotidové repetice, které nenarušují čtecí rámec (Primmer *et al.*, 1997).

3.1.1.1 Vlastnosti mikrosatelitů

Mikrosatelitové sekvence se vyznačují vysokým polymorfismem v délce, resp. v počtu repetic. Hypervariabilita jednotlivých lokusů je často způsobena chybou polymerázy při replikaci genomu. Mutační rychlost mikrosatelitů je v případě člověka $10^{-4} - 10^{-5}$ na meiózu na jednu generaci, což je dostatečně vysoká rychlost, aby vzniknul polymorfismus, a zároveň úměrně nízká, aby se konkrétní alela přenesla do potomstva (Bruford & Wayne, 1993). Alelická variabilita je velmi vysoká, heterozygotnost dosahuje až 90 % (Ellegren, 1992). Alely jsou kodominantní a přenášejí se do potomstva podle pravidel klasické mendelistické dědičnosti, tzn. že potomek by měl vykazovat nějakou kombinaci alel ze všech možných kombinací rodičovských alel (Weber & May, 1989; Ellegren, 1992; Bruford & Wayne, 1993).

Z hlediska jednolitosti repetice lze mikrosatelity rozdělit do tří skupin, a to na dokonalé (perfect), nedokonalé (imperfect) a složené (compound) (Weber, 1990). Sekvence dokonalého mikrosatelitu se skládá pouze z jednotek repetice, lokus je tzv. čistý. Nedokonalý mikrosatelit má repetici přerušenu několika nukleotidy, ale repetice poté opět pokračuje. V případě složeného mikrosatelitu se jedná o dva motivy repetice, které jdou po sobě – nejdříve jeden motiv několikrát, po něm následuje několik repetitivních jednotek druhého motivu (Kalia *et al.*, 2010).

3.1.1.2 Detekce mikrosatelitových lokusů

Detekci mikrosatelitů lze provádět několika způsoby. Pokud není lokus ještě popsán, tzn. je ve fázi hledání, je jednou možností použití značených sond. Sondy jsou specifické pro určité repetitivní motivy, díky tomu je možné určit jak pozitivní bac klony, tak motiv repetice (Ellegren, 1992; Double *et al.*, 1997). Druhou možností je sekvenace genomu zkoumaného organismu a následné vyhledání repetitivních sekvencí.

Pokud je mikrosatelitový lokus již popsán, nejjednodušší metodou jeho detekce *in vitro* je použití PCR techniky (Ellegren, 1992). Pomocí známých párů primerů se daný lokus amplifikuje a produkty se následně separují v gelu. Oproti minisatelitům jsou mikrosatelity značně kratší, v délce řádově stovek bp, a proto jsou pro

Taq-polymerázu ideálním substrátem. Kombinací PCR amplifikace a separace v polyakrylamidovém (PAA) gelu je možné rozlišit i alely lišící se o jeden nukleotid (Bruford & Wayne, 1993). Rozdíl v délce alely pouze o několik páru bazí je při použití Southern blottingu nedetekovatelný, navíc k PCR reakci stačí velmi malé množství DNA (Litt & Luty, 1989; Questiau *et al.*, 1999).

PCR techniku poprvé popsal Kary Mullis v roce 1983. Jedná se o *in vitro* amplifikaci templátu pomocí termostabilní *Taq*-polymerázy. *Taq*-polymeráza je enzym, který se izoluje z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* žijící v blízkosti sirných mořských pramenů. Stabilita této DNA-polymerázy při vysokých teplotách je klíčovou vlastností pro průběh PCR reakce – aby došlo k oddělení obou vláken a nasednutí primerů na templát, je nutné DNA denaturovat při 94 °C.

V PCR mixu jsou kromě DNA, *Taq*-polymerázy a páru komplementárních primerů také nutné hořčičnaté ionty, deoxyribonukleotidy a speciální pufr pro DNA-polymerázu. Celá reakce probíhá ve vodném prostředí.

Po proběhnutí PCR amplifikace je třeba vzniklé produkty oddělit a detekovat. Separace produktů se provádí v buď v agarózovém nebo PAA gelu pomocí elektrického pole. Fragmenty DNA mají záporný náboj a putují gelem směrem k anodě, přičemž se zároveň dělí na základě své délky (molekulové hmotnosti). Separované produkty se poté v případě agarózového gelu barví ethidium bromidem, u PAA gelu se používá vizualizace pomocí AgNO₃. Detekci rozdělených produktů je možné provést i s pomocí fluorescenčních značek, ale v tomto případě je nutné mít předem značené primery nebo nukleotidy.

3.1.1.3 Využití mikrosatelitů

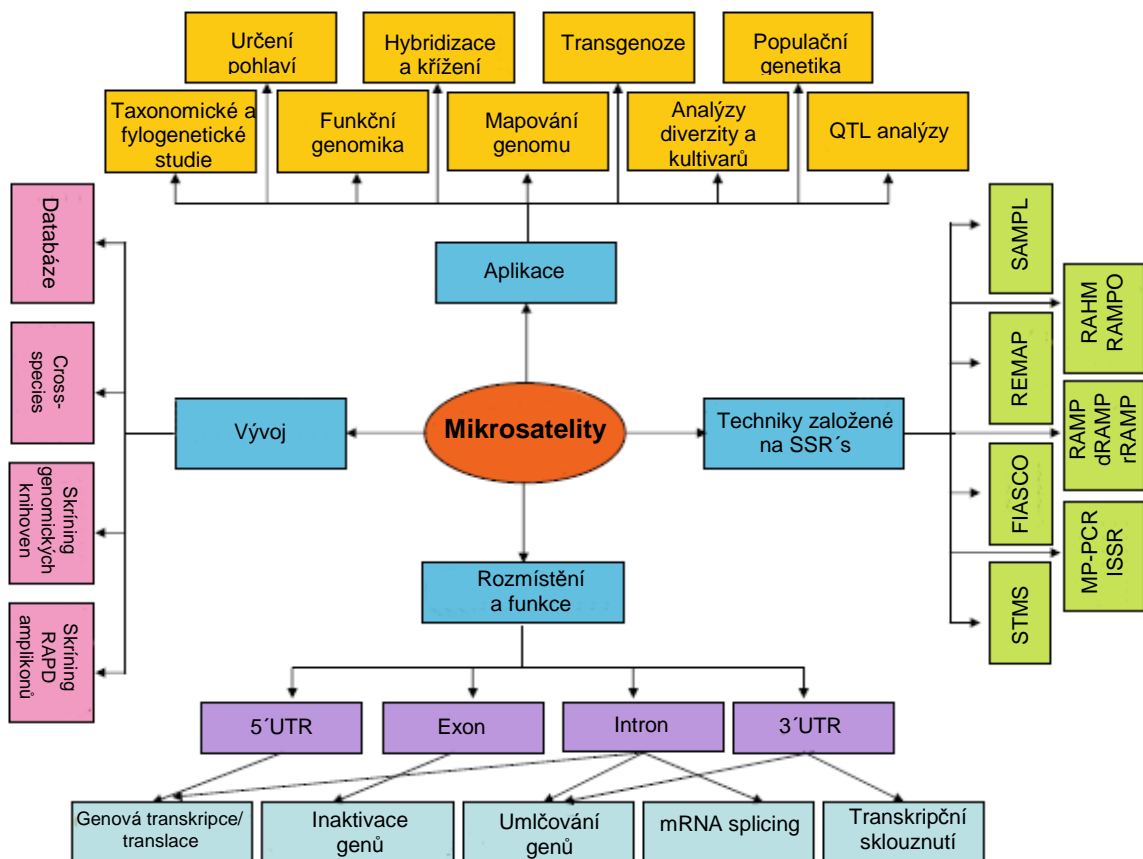
Použití mikrosatelitů ve výzkumu má několik podstatných výhod. Jednou z nich je dostupnost mikrosatelitových lokusů, které už byly popsány. Další výhodou je snadná identifikace jednotlivých lokusů a jejich alel pomocí techniky PCR a následné separace amplifikovaných produktů v gelu (Tautz, 1989; Bruford & Wayne, 1993; Blouin *et al.*, 1996).

Mikrosatelity jako markery nahradily multilokusový DNA fingerprinting při analýzách rodičovství. Vzhledem k vysoké variabilitě, kodominanci alel a dědičnosti podle Mendlových zákonů je možné s téměř 100% pravděpodobností určit správného možného otce už při kombinaci 5 nezávislých lokusů (Ellegren, 1992; Double *et al.*,

1997). Pomocí DNA fingerprintingu bylo možné určit pouze potencionální páry rodič – potomek v závislosti na procentuálním sdílení bandů. Navíc bylo nutné DNA fingerprinting kalibrovat pro každou populaci zvlášť podle známých příbuzenských vztahů (Blouin *et al.*, 1996, Krokene *et al.*, 1996; Johnsen *et al.*, 1998b).

Kromě studia příbuzenských vztahů lze mikrosatelity použít jako markery pro genetické mapování (Dawson *et al.*, 2006) a systematické studie. Další obsáhlou oblastí jsou populační studie, ve kterých se zkoumá tok genů, migrace jedinců, identifikace hybridů nebo konkrétní zastoupení jednotlivých lokusů a alel (Primmer *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2005). V oblasti humánní medicíny našly mikrosatelity uplatnění ve forenzních vědách, kdy lze pomocí PCR identifikovat jedince i z poškozeného nebo starého vzorku DNA (Bantock *et al.*, 2008). Kompletní přehled využití mikrosatelitů v současnosti je uveden níže (obr. 1).

Obr.1: Schéma celkového přehledu využití, výskytu, funkce a vývoje mikrosatelitů.
Převzato a upraveno dle Kalia *et al.*, 2010.



3.1.1.4 Orthologní mikrosatelity

Pod pojmem „orthologní gen“ se skrývá ta samá genetická informace, která je ale přítomná u dvou různých organismů. V případě mikrosatelitů platí podobný vztah - jako orthologní se označují lokusy, které byly popsány nebo odvozeny u různých druhů, ale přitom se jedná o tytéž. Tyto mikrosatelity mají stejnou sekvenci a často se nacházejí i na stejných místech v genomu (Dawson *et al.*, 2006).

3.2 CROSS-SPECIES AMPLIFIKACE MIKROSATELITŮ

Hledání nových mikrosatelitových markerů je obtížné a finančně nákladné. Z toho důvodu vědci v některých případech testují již známe lokusy na nových druzích. Tato technika se označuje jako *cross-species* amplifikace mikrosatelitů. Zjišťuje se, zda mikrosatelitový lokus, který je primárně popsán u určitého druhu, poskytne při PCR amplifikaci polymorfni produkt u druhu jiného (Ellegren, 1992; Primmer *et al.*, 1996). Nejlepších výsledků se dosahuje u blízce příbuzných druhů, s rostoucí fylogenetickou vzdáleností úspěšnost amplifikace polymorfni produktů klesá (Galbusera *et al.*, 2000; Dawson *et al.*, 2006).

Pro zajištění úspěšnosti amplifikační reakce je nutná vysoká konzervativnost sekvencí, které ohraničují oblast mikrosatelitu a na které nasedají primery. Selhání PCR je většinou způsobeno mutací v tomto místě (Bruford & Wayne, 1993; Primmer *et al.*, 1996). V takovém případě se mluví o tzv. nulových alelách. Testovaný druh má v genomu přítomnou tuto nulovou alelu, ale nelze ji identifikovat pomocí PCR. Přítomnost nulových alel je možné předpokládat podle vysoké četnosti homozygotů v populaci, přesné určení lze provést pouze s použitím sekvenátoru nebo s použitím nově navrhnutých párů primerů.

3.2.1 Faktory ovlivňující *cross-species* amplifikaci

Jak je uvedeno výše, nejpodstatnější podmínkou pro úspěch *cross-species* amplifikace je genetická vzdálenost mezi původním a testovaným druhem (Galbusera *et al.*, 2000; Primmer *et al.*, 2005; Küpper *et al.*, 2008). Primmer *et al.* (2005) se snažili najít univerzální marker, který by spolehlivě vyjadřoval fylogenetickou vzdálenost mezi dvěma druhy. Následně by bylo možné pomocí tohoto markeru předem odhadnout

úspěšnost amplifikace a vznik polymorfního produktu. Zaměřili se na mitochondriální gen *cytb*, který kóduje enzym cytochrom b. Cytochrom b je nezbytná součást dýchacího řetězce, lze tedy předpokládat jeho značnou konzervativnost. Určení genetické vzdálenosti pomocí *cytb* je tedy přesnější a spolehlivější než dříve používaná DNA-DNA hybridizace (Primmer & Ellegren, 1998; Primmer *et al.*, 2005).

Primmer *et al.* (1996) zjistili, že se vzrůstající genetickou vzdáleností se dále zkracuje průměrná délka repetice. Počet repetic daného lokusu u původního druhu má také spojitost s počtem alel i s množstvím ostatních druhů, které lokus amplifikovaly – čím vyšší je počet repetic, tím vyšší je polymorfismus a úspěšná amplifikace u více druhů (Neff & Gross, 2001; Primmer *et al.*, 2005; Küpper *et al.*, 2008).

Cross-species amplifikaci je možné ovlivnit i v průběhu samotné PCR reakce. Pokud se sníží teplota annealingu, primery nasednou na sekvence, které k nim nejsou stoprocentně komplementární. Úspěšnost amplifikace při prvním testování *cross-species* mikrosatelitu lze zvýšit pomocí snížení teploty annealingu o 5 – 10 °C, než bylo optimum u původního druhu (Ellegren, 1992; Primmer *et al.*, 2005).

3.3 DETERMINACE POHLAVÍ U TŘÍDY AVES

3.3.1 Pohlavní chromozomy

System pro rozlišení pohlaví u třídy ptáků je založen na pohlavních chromozomech Z a W. Determinace pohlaví je zde opačná než u savců – samice jsou heterogametické ZW, samci homogametičtí s konstitucí ZZ. Oba chromozomy jsou metacentrické, během meiózy na nich dochází ke vzniku synapsí na konci krátkého raménka. Chromozom Z je výrazně větší, obsahuje až 10 % chromatinu z celého genomu. Oproti tomu je chromozom W malý, těžko odlišitelný od mikrochromozomů. W obsahuje jen několik málo genů, je tvořen převážně konstitutivním heterochromatinem a na jeho koncích se vyskytují oblasti s „pozdě se replikující“ repetitivní satelitní DNA (Ellegren, 2000).

Ptačí pohlavní chromozomy se pravděpodobně vyvinuly z jiného páru autozómů než savcí, v rámci třídy Aves se odlišují i pohlavní chromozomy běžců (Ratitae). K vývoji a diferenciaci ptačích chromozomů zřejmě došlo před cca 60 až 100 miliony let (Fridolfsson *et al.*, 1998).

3.3.2 Metody pro určení pohlaví u ptáků

Určit pohlaví ptačích jedinců pouze podle morfologických znaků je ve většině případů velmi obtížné, u nedospělých jedinců dokonce nemožné. Z tohoto důvodu hledají vědci markery, pomocí nichž by bylo relativně snadné určit pohlaví na úrovni genomu. Převážně se jedná o pohlavně vázané geny nebo některé nekódující sekvence (mikrosatelity).

3.3.2.1 Pohlavně vázané geny

Geny vázané na pohlaví se mezi ptáky a savci liší. Gen *CHDI* se u savců vyskytuje na chromozomu 5, jeho ptačí analog je však umístěn na pohlavních chromozomech. Ellegren (1996) objevil 2 formy genu *CHDI*, a to *CHDIZ* a *CHDIW*. Oblasti obsahující tyto geny spolu nerekombinují, pravděpodobně se tedy vyvíjely nezávisle na sobě. Ke zjištění pohlaví jedince se využívá převážně gen *CHDIW*. Pomocí něho se testuje přítomnost W chromozomu s využitím metody Southern blottingu a hybridizací W-specifických prób. Tento způsob testování má ale jednu komplikaci, a tou je přítomnost druhé, nepohlavní kopie genu, označované jako *CHD-NW*, která se může vyskytovat kdekoli v genomu (Griffiths *et al.*, 1996). V tomto případě je nutné ověřit „správnost“ sekvence, a to buď Southern blottingem, nebo pomocí PCR, kde se amplifikované produkty odlišují svojí délkou (Ellegren & Sheldon, 1997).

Charakterizaci pohlaví lze provést i s pomocí PCR techniky, kdy se pomocí páru primerů amplifikuje intronová oblast u obou variant genu *CHD* (Griffiths *et al.*, 1998). Produkty amplifikace jsou následně rozděleny v gelu. Pokud se jedná o samce, je viditelný pouze jeden band, oproti tomu samice poskytuje 2 bandy o různé velikosti (Griffiths *et al.*, 1998; Bantock *et al.*, 2007).

3.3.2.2 Méně používané metody determinace pohlaví

Jedním z prvních způsobů určení pohlaví u ptáků bylo využití laparoskopie, kdy se přímo zkoumaly ptačí gonády. Použití této metody ale nebylo vhodné pro malé druhy nebo pro mláďata, protože zavedení sondy do kloaky bylo téměř fyzicky nemožné (Griffiths, 2000).

Další možností je využití cytologických metod, kdy se zjišťuje karyotyp jedince nebo se měří množství DNA obsažené v buňkách pomocí průtokového cytometru (Ellegren & Sheldon, 1997; Griffiths, 2000).

Determinace pohlaví lze provést i pomocí RAPD a AFLP technik. V obou případech je nutné nejdříve vytvořit DNA profily jedinců se známým pohlavím, porovnat je mezi sebou a vyhledat pohlavně specifické bandy. Takto vyhledané markery jsou použitelné pouze pro druh, ve kterém byly identifikovány. AFLP techniku je možné použít pro určení pohlaví u řádu běžců (*Ratitae*), kde jiné metody selhávají (Lessells & Mateman, 1998; Griffiths & Orr, 1999; Griffiths, 2000; Wu *et al.*, 2007).

3.3.2.3 Determinace pohlaví pomocí mikrosatelitů

V posledních 20 letech se vědci zaměřili na hledání pohlavně vázaných mikrosatelitů (Longmire *et al.*, 1993; Delehanty *et al.*, 1995; Nesje & Røed, 2000). Jejich využití je většinou omezeno pouze na druh, u kterého byly popsány, nicméně mohou poskytnout další informace o evolučním vývoji. Více pozornosti se také dostalo pohlavně vázaným markerům v hospodářské oblasti, kde je často využíváno pouze jedinců jednoho pohlaví (Jakse *et al.*, 2008, Liao *et al.*, 2009).

Vyhledávání nových pohlavně vázaných genetických markerů, resp. mikrosatelitů, je poměrně pracný proces. Jedincům, u kterých je známo pohlaví, se odebere vzorek tkáně, ze které se vyizoluje DNA (např. krev). DNA je naštěpena pomocí restriktáz a jednotlivé fragmenty jsou separovány v gelu. Poté následuje transfer na nylonovou membránu (Southern blotting) a hybridizace s komerčně dostupnými sondami, které odpovídají jednotlivým mikrosatelitovým repetičím. Nakonec se porovnáním profilů mezi pohlavími vytipují konkrétní mikrosatelitové lokusy (Longmire *et al.*, 1993; Delehanty *et al.*, 1995; Griffiths, 2000).

Pohlavně vázané lokusy je možné odhalit i pomocí PCR a separace produktů v gelu. Při genotypování jedinců se známým pohlavím se pohlavně vázaný lokus „prozradí“ nerovnoměrných zastoupením homozygotů a heterozygotů. Pokud je lokus vázaný na Z chromozom, všechny samice vykazují homozygotní, resp. hemizygotní, konstituci alel, zatímco samci jsou jak homozygoty, tak heterozygoty. Pokud by byl lokus vázaný na W chromozom, u samců by žádný produkt PCR nevznikal.

Pro samotnou determinaci pohlaví je použití PCR s již známými pohlavně vázanými mikrosatelity asi nejjednodušší a nejrychlejší variantou. V některých případech vykazují

lokusy vazbu na pohlaví i u jiných druhů a je možné je použít pro *cross-species* amplifikaci. Je ale nutné předem ověřit, že se lokus u testovaného druhu opravdu na pohlaví váže.

Mikrosatelitových lokusů vázaných na pohlavní chromozomy není známo velké množství. Tato skutečnost je zřejmě způsobena tím, že se většina studií zabývá pouze vyhledávání nových lokusů a jejich obecným popisem a nezaměřuje se na rozložení alel mezi samci a samicemi. Mikrosatelity vázané na pohlaví se přitom vyskytují zřejmě u všech organismů, které mají pohlavní chromozomy. Byly popsány u ryb (Liao *et al.*, 2009; Fuji *et al.*, 2010), plazů (O'Meally *et al.*, 2010), savců (Shiue *et al.*, 2000; Erler *et al.*, 2004) i u dvoudomých rostlin (Jakse *et al.*, 2008).

Také v ptačí říši je možné najít pohlavně vázané mikrosatelity. Lokusy se vyskytují na obou pohlavních chromozomech, ale vazba mikrosatelitů na chromozom Z je zřejmě častější než vazba na W. Delehanty *et al.* (1995) popsali u křepele horského (*Oreortyx pictus*) jeden lokus, který se vyskytoval pouze u samic. Podobně Nesje *et al.* (2000) popsali 2 mikrosatelity vázané na W chromozom u čeledi sokolovití. Zřejmě prvním popsáním mikrosatelitem vázaným na pohlavní chromozom byl pro řád pěvců lokus Phtr3 (Fridolfsson *et al.*, 1997). Lokus se vyskytuje na chromozomu Z pouze u budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*), v případě jiných druhů pěvců se tato vazba nepotvrdila. Další mikrosatelity vázané na Z chromozomu byly popsány pro lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*, 5 lokusů) (Leder *et al.*, 2008), sojku zlověstnou (*Perisoreus infaustus*, 6 lokusů) (Jaari *et al.*, 2009; Li & Merilä, 2010), strnada rákosního (*Emberiza schoeniclus*, 4 lokusy) (Mayer *et al.*, 2008) nebo cukernatku jihoafrickou (*Promerops cafer*, 1 lokus) (Feldheim *et al.*, 2006). Pro slavíka modráčka (*Luscinia svecica*) byl pozorován pouze jeden lokus vázaný na Z chromozom, a to Pocc5 (Johnsen *et al.*, 1998b). Tento lokus u původního druhu, budníčka západního (*Phylloscopus occipitalis*), ale žádnou vazbu na pohlaví nevykazoval (Bensch *et al.*, 1997). Je možné, že v případě slavíka modráčka došlo k translokaci části autozomu na chromozom Z, podobně jako je popsáno v případě skřivana kapvernského. Populace skřivana kapvernského (*Alauda razae*) prošla v minulosti výrazným úbytkem počtu jedinců, tzv. efektem hrdla lahve (bottleneck). Brooke *et al.* (2010) se domnívali, že ve snaze o zachování variability došlo k přenosu genetické informace z několika autozomů na pohlavní chromozomy. Tato hypotéza byla podepřena zjištěním, že se na pohlavních chromozomech skřivana kapvernského vyskytuje 6 původně autozomálních mikrosatelitů. Jednalo se o lokusy Ase18 a Cuμ4, které byly vázané na Z chromozomu,

a o lokusy Ase9, Ase37, HrU2 a Mme12 vázané na chromozomu W (Brooke *et al.*, 2010).

3.4 SLAVÍK OBECNÝ

3.4.1 Charakteristika druhu

Slavík obecný (*Luscinia megarhynchos* Brehm) je malý tažný pták z čeledi drozdovitých (Turdidae) (obr. 2). Systematicky patří do řádu pěvců (Passeriformes), nadřádu letců (Neognathae) a třídy ptáků (Aves). Do čeledi Turdidae se řadí např. také červenka obecná (*Erithacus rubecula*), rehek zahradní (*Phoenicurus phoenicurus*), kos černý (*Turdus merula*) a drozd zpěvný (*Turdus philomelos*). Největší vědecký zájem je soustředěn na slavíka modráčka (*Luscinia svecica*) (Veselovský, 2001).



Obr. 2: Slavík obecný
<http://www.flickr.com/photos/56541100@N00/477351361/in/photostream/>

Slavík obecný má drobné štíhlé tělo zhruba velikosti vrabce, délka těla je přibližně 16 cm. Obě pohlaví jsou hnědě zbarvená, konce křídel a ocasní pera mají rezavou barvu, spodní část těla je světlejší. Slavík je známý především díky svému charakteristickému nočnímu zpěvu, kterým samci lákají samičky v době páření. Návrat ze zimovišť v subsaharské Africe bývá začátkem dubna, areál rozšíření zahrnuje celou střední a západní Evropu až po Malou Asii (Dungel & Hudec, 2001; Korbel & Krejča, 2001; Šťastný *et al.*, 2006).

Páry slavíka obecného hnízdí jednou ročně převážně v křovinatých oblastech, jako jsou okraje lesů, parky nebo zahrady. Hnízdo staví na zemi nebo na nižších stromech, samice snáší průměrně 5 – 6 drobných vajec. Vylíhnutí mláďat nastává po 12 – 14 dnech. Rodiče se o mladé starají do doby, než opustí hnízdo, a dokonce i několik dní poté. Odlet zpět na zimoviště nastává během července (Dungel & Hudec, 2001; Korbel & Krejča, 2001).

Slavík obecný se vyskytuje v nížinných oblastech České republiky. Poslední odhad početnosti hnízdících slavíků na našem území je z roku 2003, kdy se předpokládala přítomnost 8000 – 16000 párů (Šťastný *et al.*, 2006).

3.4.2 Studium rodu *Luscinia*

Vědecká pozornost se slavíkovi obecnému dostala už před více než 40 lety. Většina studií se zabývá jeho zpěvem – strukturou a zpěvným motivem, organizací, nebo osvojováním nových melodií (Todt, 1971; Panov *et al.*, 1978; Todt, 1998; Hultsch & Todt, 2004; Kipper *et al.*, 2004). Studium slavičí etologie se vědci začali zabývat v posledních deseti letech, nicméně hlavním informačním znakem je stále zpěv. Pomocí něho samci vyznačují svá teritoria a namlouvají si partnerky (Brumm, 2002). Hojnost a struktura zpěvu je také závislá na předpokládaném reprodukčním úspěchu – pokud získal partnerku na dobu hnízdění, přestává samec zpívat v noci a samotný zpěv není tak pestrý jako u nezadaných jedinců (Amrhein *et al.*, 2002; Keifer *et al.*, 2006; Kunc *et al.*, 2007).

Molekulární markery při studiu slavíka obecného zatím nebyly téměř využívány a nejsou ani popsány. Jedinou výjimkou jsou mikrosatelity Lm3, Lm6 a Lm26. Tyto lokusy byly přímo získány z DNA slavíka obecného a použity ke studiu mimopárové fertilizace (Amrhein *et al.*, 2004). Slavík obecný je monogamní pěvec, partneři si jsou navzájem věrní – četnost mimopárových oplození je pouze 7,5 % (Amrhein *et al.*, 2004). Tato hodnota je více než poloviční, než činí průměr získaný při studiu 73 ptáčích druhů (Wink & Dyrz, 1999).

Slavíkovi modráčkovi (*Luscinia svecica*) se dostává mnohem více vědecké pozornosti než jeho blízkému příbuznému, zvláště jsou často studovány partnerské vztahy a věrnost. Slavík modráček je také monogamní pěvec, nicméně věrnost partnerů zdaleka nedosahuje hodnot pozorovaných u slavíka obecného. Míra mimopárové fertilizace a potomků, která se pohybuje od 10 % po 50 % (v průměru 30 %), slouží jako určitý indikátor v mnoha studiích. Vědci studují pomocí četnosti mimopárové fertilizace namlouvací strategie – úspěšnost hlídání partnerky (Johnsen *et al.*, 2003), vliv vzhledu samce na udržení otcovství (Johnsen *et al.*, 1998a; Johnsen *et al.*, 2000; Johnsen *et al.*, 2001) nebo podíl samice na vyhledávání mimopárové kopulace (Fossøy *et al.*, 2006; Johnsen *et al.*, 2008).

Nejvýznamnějším a nejrozšířenějším genetickým markerem pro určení otcovství jsou mikrosatelity. Podobně jako u slavíka obecného ani pro slavíka modráčka nebyly popsány žádné původní lokusy. Všechny práce jsou založené na několika *cross-species* mikrosatelitech, u kterých byl na vzorcích slavíka modráčka v dřívějších studiích zaznamenán vznik polymorfního PCR produktu (tabulka 1). Jedná se o lokus Ase19 popsáný u rákosníka sechelského (*Acrocephalus sechellensis*) (Richardson *et al.*,

2000), Cu μ 4, Cu μ 10 a Cu μ 28 získané od drozda malého (*Catharus ustulatus*) (Gibbs *et al.*, 1999), FhU2 a FhU3 popsané u lejska černošedého (*Ficedula hypoleuca*), HrU7 popsaný u vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) (Primmer *et al.*, 1996) a o lokus Mcy μ 4 odvozený od modropáštíka nádherného (*Malurus cyaneus*) (Double *et al.*, 1997). Lokus PAT43 byl popsán u sýkory černošedé (*Poecile atricapillus*) (Otter *et al.*, 1998), Phtr2 u budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*) (Fridolfsson *et al.*, 1997), Pocc5 u budníčka západního (*Phylloscopus occipitalis*) (Bensch *et al.*, 1997) a Ppi2 u straky obecné (*Pica pica*) (Martinez *et al.*, 1999).

Určení paternity pomocí mikrosatelitů sloužilo i pro odhad procenta neplodných samců. Liffjeld *et al.* (2007) zjistili, že ve studované populaci slavíka modráčka mají 2 % až 4 % samců nedostatek vitálních spermií (tzv. azoospermie). Ačkoli tvoří modráčci páry, samice se pro snížení rizika, že snesou neoplozená vejce, často páří i s dalšími samci. Mimopárovou kopulací samice také zvyšují fitness svých potomků. Samci, se kterými se spáří, jsou zpravidla méně geneticky příbuzní než původní partner. Se zvýšením heterozygotnosti potomků se zlepší i jejich buněčná imunitní odpověď (Fossøy *et al.*, 2008; Fossøy *et al.*, 2009).

Mikrosatelity byly také použity jako markery pro rozlišení jednotlivých poddruhů a pro určení struktury populace (Johnsen *et al.*, 2006; Hellgren *et al.*, 2008). Slavíka modráčka je možné morfologicky rozdělit do několika poddruhů v závislosti na velikosti a jednodutosti modrého zbarvení na spodní části krku. Johnsen *et al.* (2006) použili celkem 11 mikrosatelitových lokusů pro genetické odlišení 7 poddruhů slavíka modráčka. Vzorke pocházely z 11 populací vyskytujících se na území Evropy a Malé Asie. Výsledkem bylo například zjištění, že česká a německá populace poddruhu *L. s. cyanecula* se od ostatních populací poměrně značně geneticky odlišuje, naopak populace *L. s. svecica* v ČR a Norsku se neliší vůbec.

Tabulka 1: Přehled *cross-species* mikrosatelitů použitých u slavíka modráčka. V tabulce jsou uvedeni autoři, kteří citovali jednotlivé lokusy a použily je ke genotypování vzorků slavíka modráčka, dále počet pozorovaných alel (k) a počet testovaných jedinců (N). V několika studiích byly uvedeny pouze počty testovaných jedinců, nikoli zjištěný počet alel (vyznačeno pomlčkou). V tabulce nejsou zahrnuty lokusy Fhy (Leder *et al.*, 2008). Přehled lokusů Fhy testovaných v této diplomové práci je uveden v kapitole Diskuze, tabulka 8.

Mikros. lokus	Studie	k	N
Ase19	Fossøy <i>et al.</i> , 2006	19	261
	Johnsen <i>et al.</i> , 2006	21	354
	Johnsen <i>et al.</i> , 2008	-	313
Cuμ4	Fossøy <i>et al.</i> , 2006	20	260
	Johnsen <i>et al.</i> , 2006	20	358
	Johnsen <i>et al.</i> , 2008	-	313
Cuμ10	Johnsen <i>et al.</i> , 2006	18	359
Cuμ28	Fossøy <i>et al.</i> , 2006	15	257
	Johnsen <i>et al.</i> , 2008	-	313
FhU2	Primmer <i>et al.</i> , 1996	4	5
	Johnsen <i>et al.</i> , 1998a	-	493
	Johnsen <i>et al.</i> , 1998b	7	15
	Johnsen <i>et al.</i> , 2000	-	284
	Johnsen <i>et al.</i> , 2001	-	630
	Fossøy <i>et al.</i> , 2006	11	234
	Johnsen <i>et al.</i> , 2006	12	363
	Johnsen <i>et al.</i> , 2008	-	152
	FhU3	Primmer <i>et al.</i> , 1996	2
Johnsen <i>et al.</i> , 1998a		-	493
Johnsen <i>et al.</i> , 1998b		9	15
Johnsen <i>et al.</i> , 2000		-	284
Johnsen <i>et al.</i> , 2001		-	630
FhU4	Primmer <i>et al.</i> , 1996	4	5
HrU1	Primmer <i>et al.</i> , 1996	1	5
HrU2	Primmer <i>et al.</i> , 1996	2	5
HrU3	Primmer <i>et al.</i> , 1996	2	5
HrU7	Primmer <i>et al.</i> , 1996	4	5
	Johnsen <i>et al.</i> , 1998a	-	493
	Johnsen <i>et al.</i> , 1998b	10	15
	Johnsen <i>et al.</i> , 2000	-	284
	Johnsen <i>et al.</i> , 2001	-	630
	Fossøy <i>et al.</i> , 2006	15	260
	Johnsen <i>et al.</i> , 2006	13	356
	Johnsen <i>et al.</i> , 2008	-	152

Mikros. lokus	Studie	k	N
Mcyμ4	Johnsen <i>et al.</i> , 1998a	-	493
	Johnsen <i>et al.</i> , 1998b	18	15
	Johnsen <i>et al.</i> , 2000	-	284
	Fossøy <i>et al.</i> , 2006	23	264
	Johnsen <i>et al.</i> , 2006	26	364
	Johnsen <i>et al.</i> , 2008	-	313
PAT43	Fossøy <i>et al.</i> , 2006	23	266
	Johnsen <i>et al.</i> , 2006	22	362
	Johnsen <i>et al.</i> , 2008	-	313
Phtr2	Johnsen <i>et al.</i> , 1998a	-	493
	Johnsen <i>et al.</i> , 1998b	16	15
	Johnsen <i>et al.</i> , 2000	-	284
	Johnsen <i>et al.</i> , 2001	-	630
	Fossøy <i>et al.</i> , 2006	19	215
	Johnsen <i>et al.</i> , 2006	19	363
	Johnsen <i>et al.</i> , 2008	-	313
	PmaC25	Fossøy <i>et al.</i> , 2006	7
Johnsen <i>et al.</i> , 2006		6	356
Johnsen <i>et al.</i> , 2008		-	152
Pocc5	Johnsen <i>et al.</i> , 1998a	-	493
	Johnsen <i>et al.</i> , 1998b	6	15
	Johnsen <i>et al.</i> , 2000	-	284
	Johnsen <i>et al.</i> , 2001	-	630
	Hellegren <i>et al.</i> , 2008	7	89
Ppi2	Fossøy <i>et al.</i> , 2006	34	243
	Johnsen <i>et al.</i> , 2006	37	364
	Johnsen <i>et al.</i> , 2008	-	152

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Vzorky DNA

DNA byla získána ze vzorků krve, které byly odebrány v letech 2005 – 2007 na slovenské lokalitě v katastru města Šamorín. Dospělí jedinci slavíka obecného byli odchytáváni v průběhu hnízdní sezóny, mláďata přímo na hnízdě 8. den od vylíhnutí. Všem odchyceným jedincům byl nasazen kroužek, odebrán vzorek krve pro případnou analýzu paternity a změřeny morfologické parametry. Krev byla uchována v ethanolu v mikrozkuvkách a zamrazena.

Lokalita je tvořená sítí větrolamů v oblasti Žitný ostrov (126 – 128 m.n.m), která je intenzivně hospodářsky využívaná. Celková rozloha lokality je 12,68 ha, délka větrolamů přesahuje 7 km. Stromový porost je tvořen převážně javorem babyka (*Acer campestre*), jasanem ztepilým (*Fraxinus excelsior*), jilmem habrolistým (*Ulmus minor*), topolem bílým (*Populus alba*) a trnovníkem akátem (*Robinia pseudoacacia*). V křovinném patře je zastoupen bez černý (*Sambucus nigra*), ptačí zob obecný (*Ligustrum vulgare*), růže (*Rosa* spp.) a hlohy (*Crataegus* spp.). Jednotlivé větrolamy se mezi sebou navzájem liší složením a strukturou porostu, a tím vytvářejí částečně heterogenní prostředí.

4.2 Izolace DNA z krve

Ze vzorků jsem vybrala 24 nepříbuzných jedinců, 12 samic a 12 samců. Izolaci DNA z krve jsem provedla dle postupu Maniatis *et al.* (1982) upraveného pro podmínky Laboratoře populační genetiky.

- Do mikrozkuvky o objemu 1,5 ml napipetovat ustřiženou špičkou 500 μ l Queen's pufu a přidat část sražené krve ze vzorku (cca 20 μ l). Vzorek zhomogenizovat pomocí mikrohomogenizátoru.
- Připipetovat 100 μ l roztoku proteinázy K (10 mg/ml), promíchat překlápěním a následně přidat 100 μ l 10% roztoku SDS. Mikrozkuvky nechat inkubovat přes noc za překlápění v termostatu při 37 °C.
- Druhý den ke směsi přidat 300 μ l fenolu a 300 μ l chloroformu, mikrozkuvky zvortexovat a zcentrifugovat (2000 g/ 5 min). Poté odebrat do nové mikrozkuvky pomocí ustřižené špičky pouze vrchní fázi obsahující DNA.

- K odebranému vzorku přidat 700 μl chloroformu, mikrozkuhavky zvortexovat a centrifugovat (2000 g/ 5 min). Do nové mikrozkuhavky opět odebrat ustříženou špičkou horní fázi tak, aby nedošlo k nasátí bílého zákalu proteinů z mezifáze. Tento krok jednou zopakovat.
- K odebranému roztoku přidat 180 μl vychlazeného octanu sodného ($c = 3 \text{ mol/l}$) a mikrozkuhavku vyplnit vychlazeným isopropanolem. Promíchat překlápěním a uložit do $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do druhého dne.
- Další den mikrozkuhavky centrifugovat 30 až 40 minut při 13000 g/min.
- Opatrně slít isopropanol (aby nedošlo k vylití sražené DNA) a přidat 1 ml vychlazeného ethanolu.
- Mikrozkuhavky opět centrifugovat 10 minut při 13000 g/min.
- Opatrně slít isopropanol a obsah mikrozkuhovek vysušit v termobloku.
- Do mikrozkuhovek s vysušenou DNA přidat 500 μl TE pufru a nechat rozpouštět přes noc v termostatu s překlápěním při $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Koncentraci vyizolované DNA jsem změřila pomocí fluorometru a vzorky jsem naředila tak, abych dosáhla konečné koncentrace DNA cca 20 $\mu\text{g/ml}$. Nakonec jsem vzorky DNA uložila do $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3 PCR reakce

- Do mikrozkuhavky napipetovat příslušné objemy všech složek PCR premixu (uvedeno níže). Je třeba všechny složky před použitím zvortexovat a zcentrifugovat. DNA polymerázu přidat do směsi až jako poslední a udržovat ji v chladu.

Složení PCR premixu (včetně ztrát při pipetování):	6 vzorků	24 vzorků
Deionizovaná voda	44,4 μl	173,3 μl
Storage Buffer 10x (10 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/ KCl, 0,1% Triton X-100)	6,7 μl	26,1 μl
Roztok MgCl_2 , koncentrace 25 mmol/l	4,0 μl	15,6 μl
Roztok dNTPs, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$	0,7 μl	2,7 μl
Primer F, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$	3,3 μl	12,9 μl
Primer R, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$	3,3 μl	12,9 μl
<i>aTaq</i> -DNA-polymeráza 2,5 U/ μl	1 μl	3,7 μl

- Premix zvortexovat a zcentrifugovat.
- Do PCR mikrozkušavek napipetovat vždy po 1 μ l vzorku a přidat 9 μ l premixu. Strip uzavřít víčkem, popsat a umístit do termocykléru s přednastaveným programem.

Základní profil PCR reakce:

	94 °C: 5 min	
35x	{	94 °C: 30 s
		50 °C: 30 s
		72 °C: 30 s
	72 °C: 7 min	
	10 °C: ∞	

Teplota annealingu (uvedeno 50 °C) byla pro testované primery optimalizována, nejnižší použitá teplota byla 46 °C, nejvyšší 66 °C.

4.4 Gelová elektroforéza

Elektroforézu jsem provedla v sekvenační elektroforetické komůrce S2 (Whatman Biometra). Separace produktů PCR amplifikace probíhala v 6% polyakrylamidovém gelu při teplotě okolo 50 °C a limitních hodnotách proudu a napětí 150 mA a 3000 V.

4.4.1 Příprava skel a PAA gelu

- Nejprve omýt velké sklo (330 x 420 mm) destilovanou vodou, poté osušit papírovými ubrousky a omýt 96% ethanolem.
- Na velké sklo kápnout několik kapek přípravku na odpuzování vody z autoskel, pečlivě rozetřít kouskem ubrousku a nechat zaschnout.
- Malé sklo (330 x 390 mm) omýt z obou stran jarem, opláchnout destilovanou vodou, osušit ubrouskem a omýt 96% ethanolem.
- Poté malé sklo umístit do digestoře a pečlivě rozetřít molekulární lepidlo a nechat cca 5 minut zaschnout. Nakonec sklo 4x omýt 96% ethanolem.

- Velké sklo umístit do digestoře ošetřenou stranou nahoru a opláchnout destilovanou vodou. Do krajů umístit spacersy.
- Malé sklo položit ošetřenou stranou dolů na velké sklo, zarovnat spacersy s hranami skel a skla sepnout klipsy (na každé straně se spacersy dva klipsy).
- V kádince připravit 6% polyakrylamidový gel.
- Pomalu nalévat gel do mezery mezi velkým a malým sklem a jemným poklepem na skla urychlovat pohyb gelu mezi nimi.
- Až je gel nalitý po celé ploše skel, umístit do prostoru mezi skly hřebínek tak, aby byl zhruba 0,5 cm v gelu a zoubky směřovaly ven. Stranu skel s hřebínkem sepnout rovnoměrně 4 klipsy a nechat gel aspoň 1 hodinu polymerizovat.

4.4.2 Elektroforéza

- Skla se zpolymerizovaným gelem důkladně omýt od zbytků gelu a umístit do elektroforetické komůrky větším sklem vně.
- Katodový i anodový prostor zalít 0,5x TBE pufrem a vyndat hřebínek. Z prostoru mezi skly odstranit přebytečný gel a důkladně vypláchnout injekční stříkačkou.
- Zapojit elektrody, na zdroji nastavit limitní hodnotu stejnosměrného proudu 90 W a nechat gel nahřívat přibližně na 50 °C.
- Po nahřátí gelu odpojit zdroj, vyčistit mezeru mezi skly pomocí stříkačky proudem pufru a nasadit hřebínek. Zoubky hřebínku by měly být cca 1 mm hluboko v gelu.
- Do mezer vytvořených zoubky hřebínku nanést pomocí 8-kanálové pipety vždy 2 μ l PCR produktu. K PCR produktu je nutné předem přidat 5 μ l nanášecího pufru a nechat vzorek zdenaturovat v termocykléru. Před nanesením dalšího vzorku špičky vypláchnout několikerým nasátím a vypuštěním pufru. Při aplikaci mikrosatelitů určených ke genotypování nanést na gel 2 μ l všech vzorků.
- Opět zapojit zdroj stejnosměrného proudu a nechat probíhat elektroforetickou separaci PCR produktů předem určený čas při 70 W.

4.5 Barvení produktů PCR v gelu

- Po uběhnutí doby separace odpojit zdroj od komůrky, vypustit pufr z katodového prostoru a skla z komůrky vyjmout. Opatrně odstranit spacersy a skla od sebe oddělit pomocí čepele nože.

- Menší sklo položit gelem nahoru do plastové misky, zalít Fix/Stop roztokem a nechat třepat 20 min.
- Poté Fix/Stop roztok slít zpět do baňky a sklo s gelem 3x promýt v destilované vodě.
- Gel opět umístit do plastové misky, umístit na třepačku, zalít roztokem HNO₃ a nechat působit 5 min. Poté gel 4x promýt destilovanou vodou.
- Sklo umístit do misky pro barvení a zalít roztokem AgNO₃. Barvení nechat probíhat 30 minut, poté roztok slít zpět do lahve a gel rychle opláchnout v destilované vodě.
- Gel zalít vychlazenou vývojkou. Vizualizaci separovaných produktů PCR zastavit pomocí Fix/Stop roztoku ve chvíli, kdy jsou jednotlivé bandy rozlišitelné, ale kdy ještě nedošlo k přebarvení pozadí.
- Sklo s gelem ponořit do misky s destilovanou vodou a poté nechat usušit v sušičce (20 min při 80 °C).

4.6 Chemikálie

Akrylamid (Serva)

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

Bromfenolová modř (Serva)

Deionizovaná voda

Deoxyribonukleosidtrifosfáty (100 mmol/l, 400 μl každý), U1240 (Promega)

Dodecylsírán sodný (Lachema)

Dusičnan stříbrný (Lachema)

Ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)

Ethylendiaminotetraoctan sodný – Na₂EDTA (Lachema)

Fenol - ekvilibrovaný pro izolaci DNA, pH 8,0 (Sigma)

Formaldehyd (Lachema)

Formamid (Lachema)

Chlorid sodný (Lachema)

Chloroform (Lachema)

Isopropanol (Lachema)

Kyselina boritá (Lachema)

Kyselina ethylendiamintetraoctová EDTA (Lachema)

Kyselina octová – ledová (Lachema)

3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
Methylenová modř (Serva)
N-lauroylsarkosin (Sigma)
N,N'-methylenbisakrylamid (Serva)
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva)
Octan sodný trihydrát (Lachema)
Peroxodisíran amonný (APS) (Serva)
Proteináza K (Sigma)
Rain Repellent ClearVue (Turtle)
Thiosíran sodný (Lachema)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan – (Tris) (Appllichem)
Uhličitan sodný (Lachema)
Xylenová modř (Appllichem)

4.7 Rostoky

6% polyakrylamidový gel

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

Akrylamid – 6% zásobní roztok

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované H_2O
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N,N'- methylenbisakrylamid
19:1
- po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné lahvi při 4 °C

Fix/Stop roztok

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

Molekulární lepidlo

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

Nanášecí pufr

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

Na₂EDTA 0,5 mol/l – zásobní roztok

- 186,12 g dihydrátu ethylendiaminotetraoctanu sodného Na₂EDTA . 2H₂O
- rozpustit v 800 ml deionizované vody
- upravit pH na hodnotu 8,0 pomocí pevného NaOH (cca 20 g)
- objem doplnit deionizovanou vodou na 1000 ml

Peroxodisíran amonný (NH₄)₂S₂O₈ – 10% roztok

- 1 g peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈
- rozpustit v 10 ml deionizované H₂O
- uchovávat v lednici, spotřebovat cca do 2 měsíců

Queen's pufr

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 2 ml zásobního roztoku NaCl 5 mol/l
- 2,92 g EDTA
- 10 g N-lauroylsarkosinu
- rozpustit v 900 ml deionizované vody, upravit pH na hodnotu 7,5
- doplnit objem na 1000 ml deionizovanou vodou

Roztok dusičnanu stříbrného AgNO₃

- 0,8 g AgNO₃
- 800 ml deionizované vody
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Roztok 1% kyseliny dusičné HNO_3

- 12 ml 65% HNO_3
- 800 ml destilované vody

Roztok octanu sodného o $c = 3 \text{ mol/l}$, 100 ml

- 408,3 g octanu sodného trihydrátu
- rozpustit v 100 ml deionizované vody

SDS – 10% roztok, 100 ml

- 2,88 g SDS
- rozpustit v 100 ml deionizované vody

TE pufr – 10x zásobní roztok

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 200 μl zásobního roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustit v 800 ml deionizované vody, poté doplnit na 1000 ml a zfiltrvat

TBE pufr – 10x zásobní roztok

- 108 g 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

- 24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3
- 800 ml deionizované vody
- uložit ve 4 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

4.8 Přístrojové vybavení laboratoře

elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)

elektroforetický zdroj EV232 (Consort)

hybridizační pec Hybridiser HB-2D (Techne)

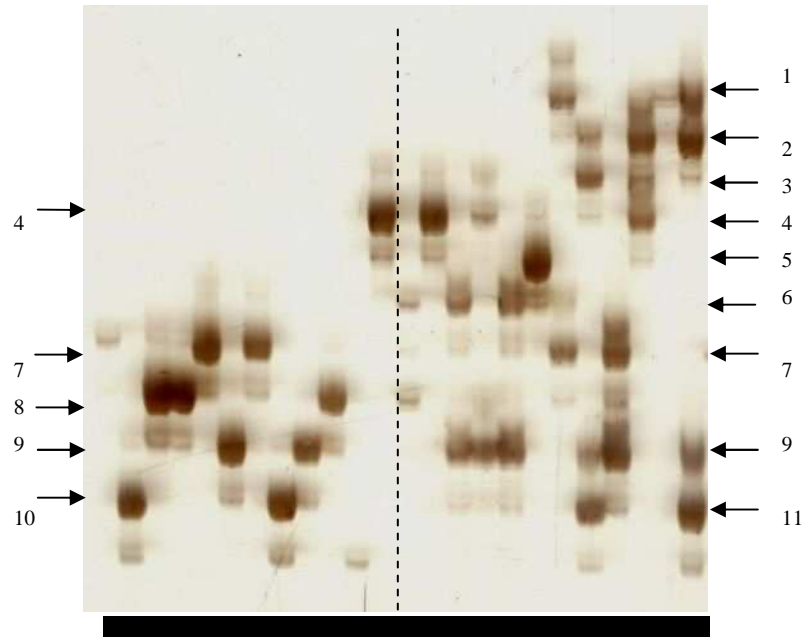
chladnička kombinovaná (Whirlpool)
laboratorní váhy MARK S 622 (BEL Engineering)
mikropipety Finnpiette 0,5-10 µl (osmikanálová) a 0,3-1000 µl (Labsystem)
mikropipety Nichipet EX 0,5-1000 µl (Nichiryo)
minicentrifuga CSL – QIKSPIN (Clever Scientific)
negatoskop NEGA1 (Maneko)
sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
sušárna HS 122A (Chirana)
temperovaný blok Dri-block DB-2D (Techne)
termocyklér PTC-100 (MJ Research)
termocyklér XP Thermal Cycler (BIOER technology)
třepačka Orbit 1900 (Labnet International)
vortex MS2 (Ika)
vyhřívání magnetická míchačka s regulací teploty a otáček MR Hei – Standard (Heidolph)
výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)



	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
█									█	█	█	
█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█

[REDACTED]

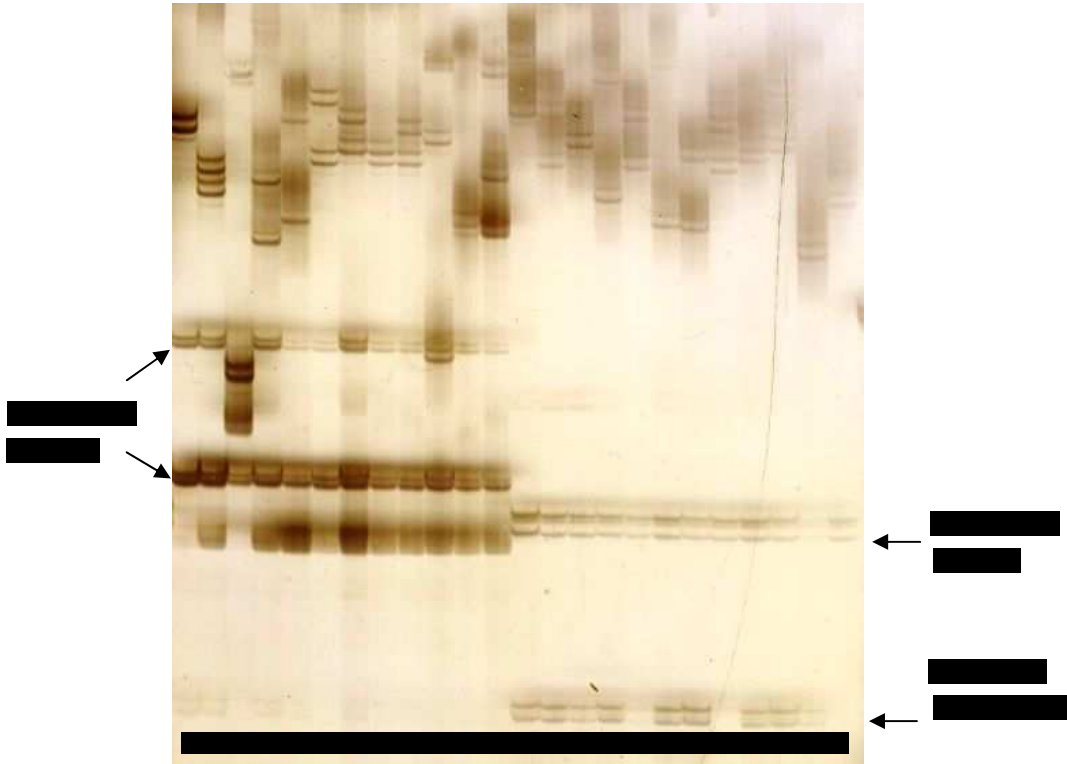
[REDACTED]



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

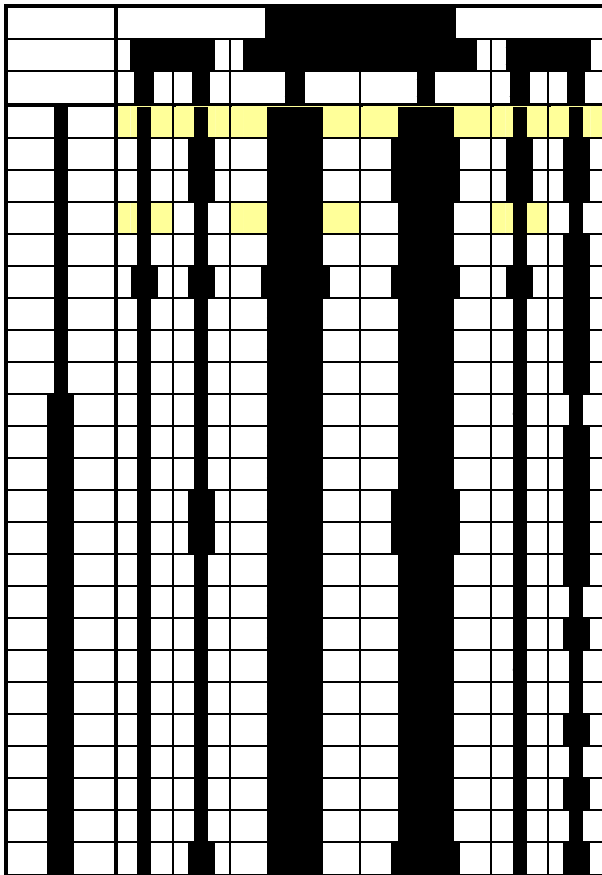
[REDACTED]

[REDACTED]

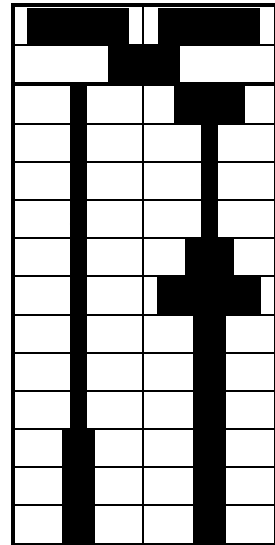
[Redacted text block]

[Redacted text block]

a)



b)



[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block] ***

***** *****

***** *****

***** *****

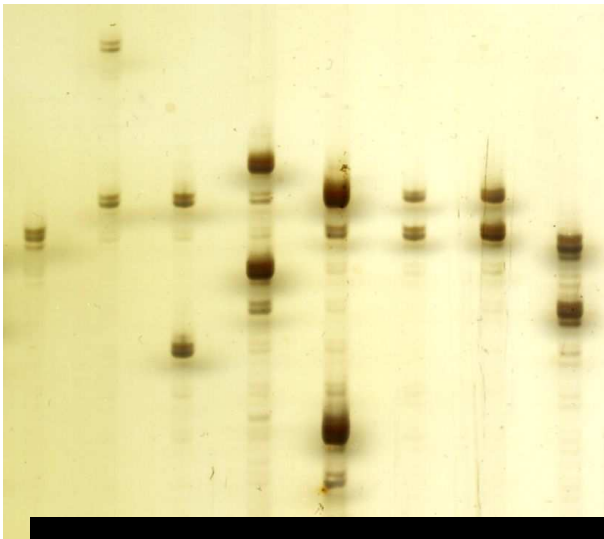
[Redacted text block]

[Redacted text block]

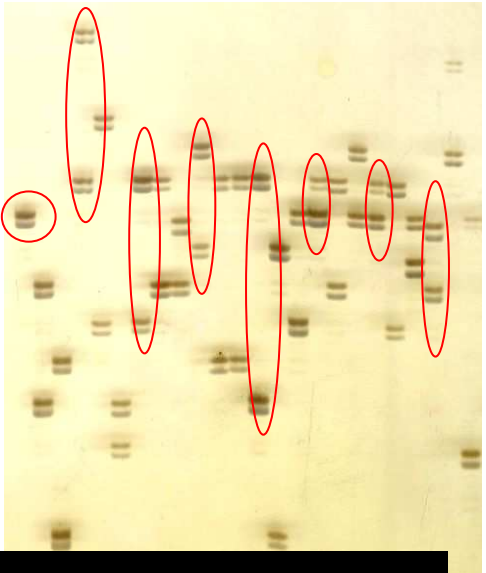
[REDACTED]

[REDACTED]

a)



b)



[Redacted text block]

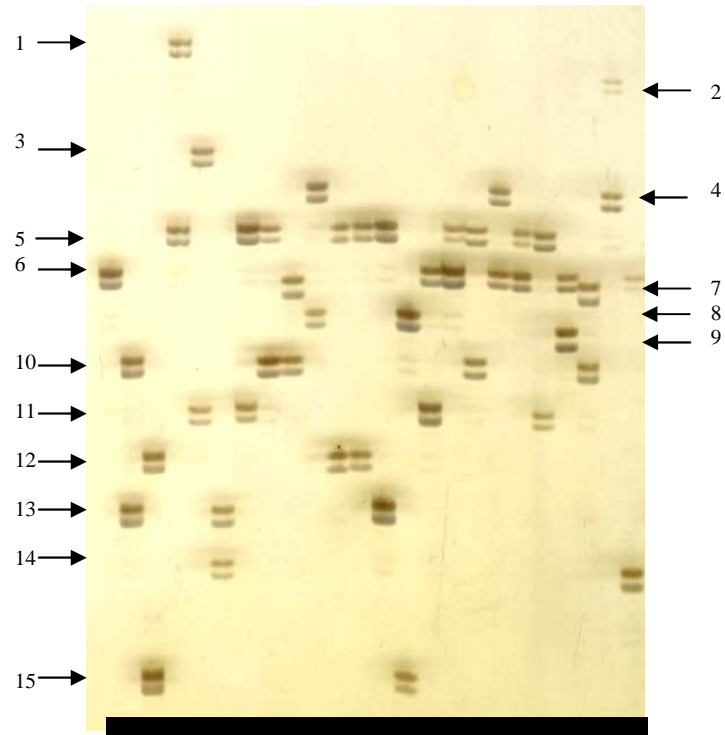
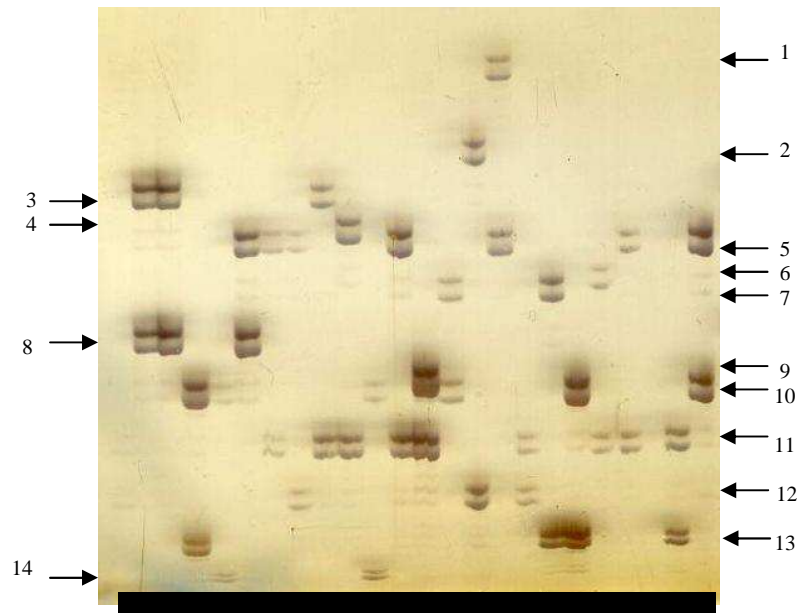
[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

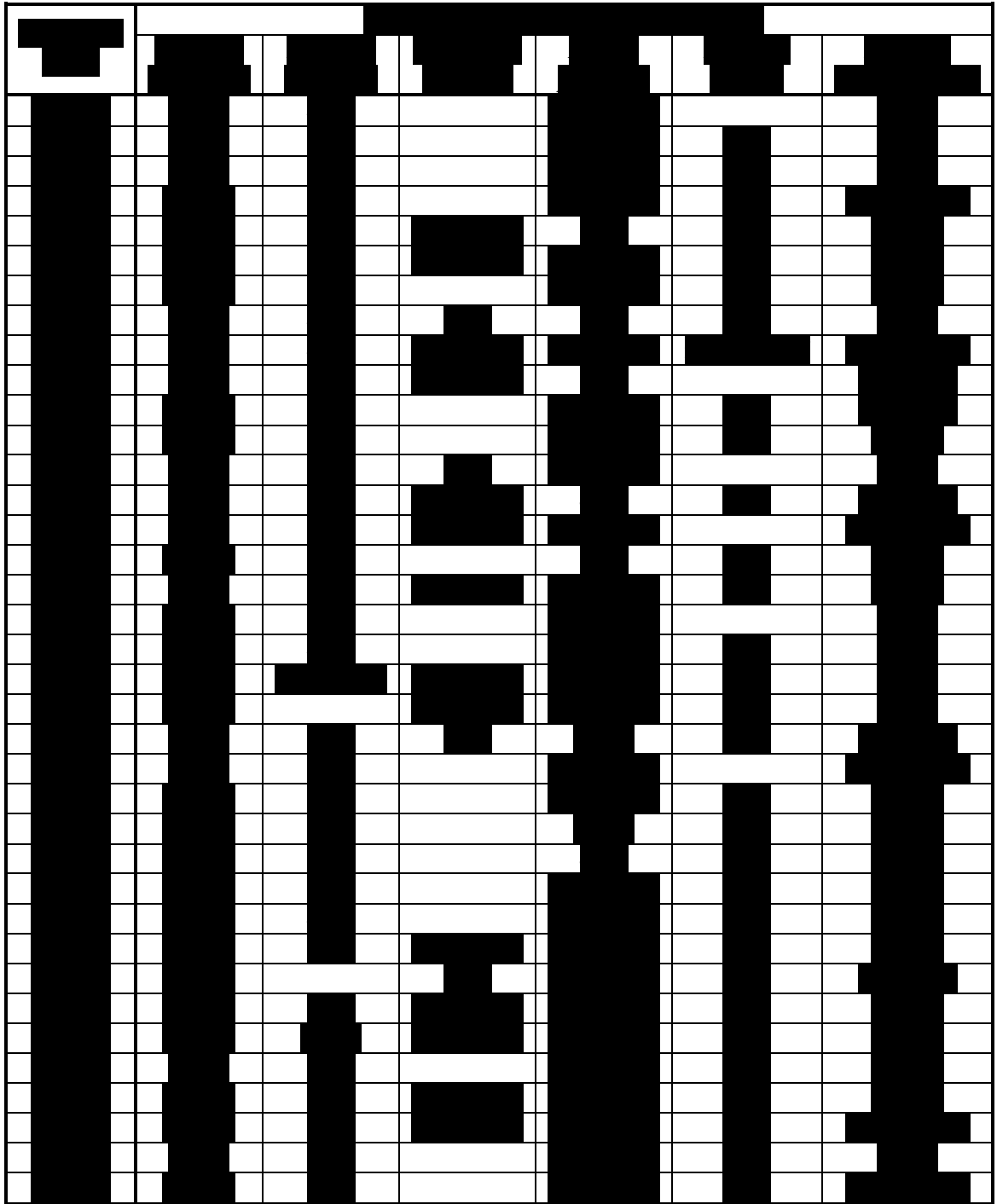
[Redacted text block]



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsem se věnovala vyhledání a charakterizaci *cross-species* mikrosatelitů, které by poskytovaly polymorfní PCR produkt u slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*).

- Nalezla jsem 32 polymorfních lokusů, které jsem dále genotypovala na 24 nepříbuzných jedincích slavíka obecného a charakterizovala je pomocí statistického programu Cervus 3.0.3. Lokusy byly původně popsány u 6 druhů pěvců, a to u lindušky préríjní, drozda malého, lejska černohlavého, vlaštovky obecné, modroplátníka nádherného a sýkory černohlavé.
- U 4 mikrosatelitů jsem pozorovala vazbu na pohlaví, konkrétně na chromozom Z.
- Pro rodičovské analýzy a testy paternity jsem ze všech testovaných mikrosatelitů vybrala 4 vhodné lokusy. Tyto mikrosatelity byly dobře hodnotitelné, poskytovaly poměrně vysoký počet alel a měly velmi nízkou pravděpodobnost výskytu nulových alel. Kombinace těchto 4 mikrosatelitů poskytuje více než 99% jistotu, že u testovaných jedinců bude správně určena paternita.
- Zajímavostí byl lokus Fhy310, který kromě samotných alel poskytoval i extra bandy specifické pro jednotlivá pohlaví. Tento lokus by bylo možné využít jak pro rodičovské analýzy, tak pro určení pohlaví testovaných jedinců.

8 SEZNAM LITERATURY

- Amrhein, V., Korner, P., Naguib, M. (2002): Nocturnal and diurnal singing activity in the nightingale: correlation with mating status and breeding cycle. *Animal Behaviour* (64): 939-944.
- Amrhein, V., Kunc, H.P., Naguib, M. (2004): Sperm competition or sex ration: Possible factors influencing singing and spatial behaviour in the nightingale. *Disertační práce*, vydáno on-line http://edoc.unibas.ch/91/1/DissB_6778.pdf.
- Bantock, T.M., Prys-Jones, R.P., Lee, P.L.M. (2008): New and improved molecular sexing for museum bird specimens. *Molecular Ecology Resources* (8): 519-528.
- Beckmann, J.S. & Weber, J.L. (1992): Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* (12): 627-631.
- Bensch, S., Price, T., Kohn, J. (1997): Isolation and characterization of microsatellite loci in a *Phylloscopus* warbler. *Molecular Ecology* (6): 91-91.
- Blouin, M.S., Parsons, M., Lacaille, V., Lotz, S. (1996): Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* (5): 393-401.
- Brooke, M.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 preserved genetic variability in an endangered lark. *Journal of Molecular Evolution* (70): 242-246.
- Bruford, M.W. & Wayne, R.K. (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* (3): 939-943.
- Brumm, H. (2002): Sound radiation patterns in Nightingale (*Luscinia megarhynchos*) songs. *Journal für Ornithologie* (143): 468-471.
- 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.
- 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): 1941-1944.
- 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.
- 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 similarity. *Molecular Ecology* (15): 1299-1320.
- Delehanty, D.J., Tybie, R.A., Ditsworth, M.J., Hoelzer, G.A., Oring, L.W., Longmire, J.L. (1995): Genetic and morphological methods for gender identification of mountain quail. *Journal of Wildlife Management* (54): 785-789.

- Double, M.C., Dawson, D., Burke, T., Cockburn, A. (1997): Finding the fathers in the least faithful bird: a microsatellite-based genotyping system for the superb fairy-wren *Malurus cyaneus*. *Molecular Ecology* (6): 691-693.
- Dungel, J. & Hudec, K. (2001): Atlas ptáků České a Slovenské republiky. Academia, Praha.
- Ellegren, H. (1992): Polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of microsatellites – a new approach to studies of genetic relationships in birds. *The Auk* (109): 886-895.
- Ellegren, H. (1996): First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B – Biological Science* (263): 1635-1641.
- Ellegren, H. & Sheldon, B.C. (1997): New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. *Trends in Ecology & Evolution* (12): 255-259.
- Ellegren, H. (2000): Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends in Ecology & Evolution* (15):188-192.
- Erler, A., Stoneking, M., Kayser, M. (2004): Development of Y-chromosomal microsatellite markers for nonhuman primates. *Molecular Ecology* (13): 2921-2930.
- Feldheim, K.A., McFarlane, M.L., Bowie, R.C. (2006): Isolation of highly polymorphic autosomal microsatellite loci and a sex-linked locus from sugarbirds. *Molecular Ecology Notes* (6): 1019-1021.
- Fossøy, F., Johnsen, A., Lifjeld, J.T. (2006): Evidence of obligate female promiscuity in a socially monogamous passerine. *Behavioral Ecology and Sociobiology* (60): 255-259.
- Fossøy, F., Johnsen, A., Lifjeld, J.T. (2008): Multiple genetic benefits of female promiscuity in a socially monogamous passerine. *Evolution* (62): 145-156.
- Fossøy, F., Johnsen, A., Lifjeld, J.T. (2009): Cell-mediated immunity and multi-locus heterozygosity in the bluethroat nestlings. *Journal of Evolution Biology* (22): 1954-1960.
- 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.
- Fridolfsson, A.K., Cheng, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Liu, H.C., Raudsepp, T., Woodage, T., Chowdhary, B., Halverson, J., Ellegren, H. (1998): Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* (95): 8147-8152.
- Fuji, K., Yoshida, K., Ozaki, A., Araki, K., Okauchi, M., Kubota, S., Okamoto, N., Sakamoto, T. (2010): Identification of the sex-linked locus in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* (308): 551-555.
- Galbusera, P., van Dongen, S., Matthysen, E. (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* (1): 163-168.
- Gibbs, H.L., Tabak, L.M., Hobson, K. (1999): Characterization of microsatellite DNA loci for a neotropical migrant songbird, the Swainson's thrush (*Catharus ustulatus*). *Molecular Ecology* (8): 1551-1552.

- 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.
- Griffiths, R., Daan, S., Dijkstra, C. (1996): Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B – Biological Science* (263): 1251-1256.
- Griffiths, R., Double M.C., Orr, K., Dawson, R.J.G. (1998): A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* (7): 1071-1075.
- Griffiths, R. & Orr, K. (1999): The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Molecular Ecology* (8): 671-674.
- Griffiths, R. (2000): Sex identification in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* (9): 14-26.
- Hamada, H., Petrino, M.G., Kakunaga, T. (1982): A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* (79): 6465-6469.
- Hamada, H., Petrino, M.G., Kakunaga, T., Seidman, M., Stollar, B.D. (1984): Characterization of genomic poly(dT-dG) . poly(dC-dA) sequences: Structure, organization, and conformation. *Molecular and Cellular Biology* (4): 2610-2621.
- Hansson, B., Bensch, S., Hasselquist, D., Lillandt, B.G., Wennerberg, L., 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.
- Hellgren, O., Bensch, S., Hobson, K.A., Lindström, A. (2008): Population structure and migratory direction of Scandinavian bluethroats *Luscinia svecica* – a molecular, morphological and stable isotope analysis. *Ecography* (31): 95-103.
- Hultsch, H., Todt, D. (2004): Approaches to the mechanisms of song memorization and singing provide evidence for a procedural memory. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* (76): 219-230.
- Jaari, S., Li, M.H., Merilä, J. (2009): A first-generation microsatellite-based genetic linkage map of the Siberian jay (*Perisoreus infaustus*): insights into avian genome evolution. *BMC Genomics* (10): 1.
- Jakse, J., Stainer, N., Kozjak, P., Cerenak, A., Javornik, B. (2008): Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding* (21): 139-148.
- Jiskrová, E. (2009): Polymorfní DNA mikrosatelity u slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Johnsen, A., Andersson, S., Örnberg, J., Lifjeld, J.T. (1998a): Ultraviolet plumage ornamentation affects social mate choice and sperm competition in bluethroats (Aves: *Luscinia s. svecica*): a field experiment. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B – Biological Science* (265): 1313-1318.

- Johnsen, A., Lifjeld, J.T., Rohde, P.A., Primmer, C.R., Ellegren, H. (1998b): Sexual conflict over fertilizations: female bluethroats escape male paternity guards. *Behavioral Ecology and Sociobiology* (43): 401-408.
- Johnsen, A., Fiske, P., Amundsen, T., Lifjeld, J.T., Rohde, P.A. (2000): Colour bands, mate choice and paternity in the bluethroat. *Animal Behaviour* (59): 111-119.
- Johnsen, A., Lifjeld, J.T., Andersson, S., Örnborg, J., Amundsen, T. (2001): Male characteristics and fertilization success in bluethroats. *Behaviour* (138): 1317-1390.
- Johnsen, A., Lifjeld, J.T., Krokene, C. (2003): Age - related variation in mating – guarding intensity in the Bluethroat (*Luscinia s. svecica*). *Ethology* (109): 147-158.
- Johnsen, A., Andersson, S., Fernandez, J.G., Kempnaers, B., Pavel, V., Questiau, S., Raess, M., Rindal, E., Lifjeld, J.T. (2006): Molecular and phenotypic divergence in the bluethroat (*Luscinia svecica*) subspecies complex. *Molecular Ecology* (15): 4033-4047.
- Johnsen, A., Pärn, H., Fossøy, F., Kleven, O., Laskemoen, T., Lifjeld, J.T. (2008): Is female promiscuity constrained by the presence of her social mate? An experiment with bluethroats *Luscinia svecica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* (62): 1761-1767.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K. (2010): Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* (177): 309-334.
- 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): 1099-1016.
- Keifer, S., Spiess, A., Kipper, S., Mundry, R., Sommer, C., Hultsch, H. (2006): First-year common nightingales (*Luscinia megarhynchos*) have smaller song-type repertoire sizes than older males. *Ethology* (112): 1217-1224.
- Kipper, S., Mundry, R., Hultsch, H., Todt, D. (2004): Long-term persistence of song performance rules in nightingales (*Luscinia megarhynchos*): A longitudinal field study on repertoire size and composition. *Behaviour* (141): 371-390.
- Korbel, L. & Krejča, J. (2001): Velká kniha živočichů. Vydavatel'stvo Příroda, s.r.o., Bratislava.
- Krokene, C., Anthonisen, K., Lifjeld, J.T., Amundsen, T. (1996): Paternity and paternity assurance behaviour in the bluethroat, *Luscinia s. svecica*. *Animal Behaviour* (52): 405-417.
- Kunc, H.P., Amrhein, V., Naguib, M. (2007): Vocal interaction in common nightingales (*Luscinia megarhynchos*): males take it easy after pairing. *Behavioral Ecology and Sociobiology* (61): 557-563.
- Küpper, C., Burke, T., Székely, T., Dawson, D. (2008): Enhanced cross-species utility of conserved microsatellite markers in shorebirds. *BMC Genomics* (9): 502.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L. (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acid Research* (21): 1111-1115.
- Leder, E.H., Karaiskou, N., Primmer, C.R. (2008): Seventy new microsatellites for the pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca* and amplification in other passerine birds. *Molecular Ecology Resources* (8): 2150-2153.

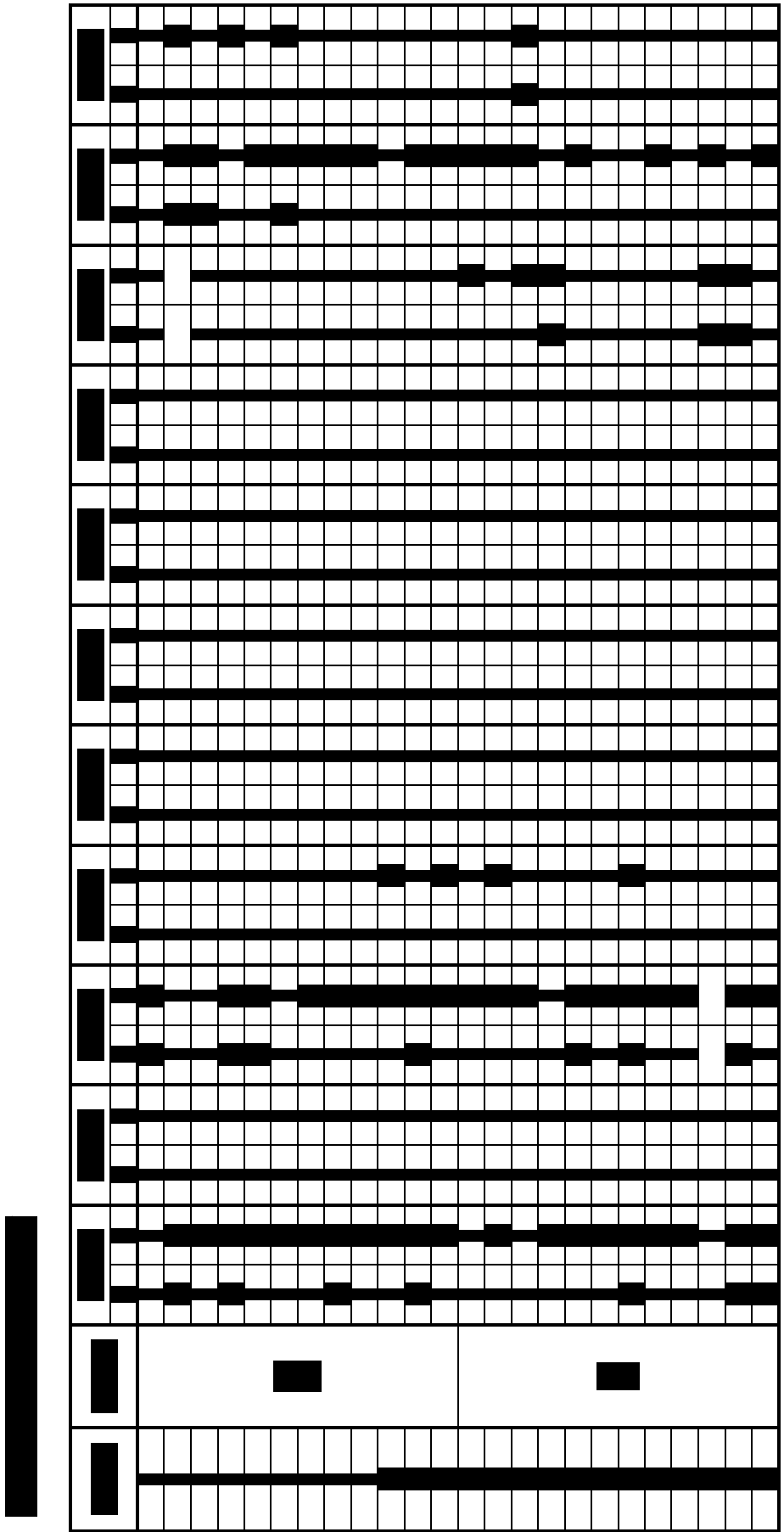
- Lessells, C.M. & Mateman, A.C. (1998): Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology* (7): 187-195.
- Li, M.H., Merilä, J. (2010): Genetic evidence for male-biased dispersal in the Siberian jay (*Perisoreus infaustus*) based on autosomal and Z-chromosomal markers. *Molecular Ecology* (19): 5281-5295.
- Liao, X., Ma, H.Y., Xu, G.B., Saho, C.W., Tian, Y.S., Ji, Y.S., Yang, J.F., Chen, S.L. (2009): Construction of a genetic linkage map and mapping of a female-specific DNA marker in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology* (11): 699-709.
- Lifjeld, J.T., Laskemoen, T., Fossøy, F., Johnsen, A., Kleven, O. (2007): Functional infertility among territorial males in two passerine species, the willow warbler *Phylloscopus trochilus* and the bluethroat *Luscinia svecica*. *Journal of Avian Biology* (38): 267-272.
- Lillandt, B.G., Bensch, S., Hansson, B., Wennerberg, L., von Schantz, T. (2002): Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci in the Siberian jay (*Perisoreus infaustus*). *Hereditas* (137): 157-160.
- Litt, M., Luty, J.A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by un vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* (44): 297-401.
- Longmire, J.L., Maltbie, M., Pavelka, R.W., Smith, L.M., Witte, S.M., Ryder, O.A., Ellsworth, D.L., Baker, R. (1993): Gender identification in birds using microsatellite DNA fingerprint analysis. *The Auk* (110): 378-381.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982): *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Martinez, 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*). *Evolution* (53): 269-273.
- Mayer, C., Schiegg, K., Pasinelli, G. (2008): Isolation, characterization and multiplex genotyping of 11 autosomal and four sex-linked microsatellite loci in the reed bunting, *Emberiza schoeniclus* (Emberizidae, Aves). *Molecular Ecology Resources* (8): 332-334.
- Melo, M. & Hansson, B. (2006): Identification of 15 polymorphic microsatellite loci in the Príncipe seedeater (*Serinus rufobrunneus*) and assessment of their utility in nine other *Serinus* species (Fringillidae, Aves). *Molecular Ecology Notes* (6): 1266-1268.
- Nádvorník, P., Pavel, V., Kučerová, L., 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.
- Neff, B.D. & Gross, M.R. (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* (55): 1717-1733.
- Nesje, M. & Røed, K.H. (2000): Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers. *Hereditas* (132): 261-263.

- Olando-Marin, J., Dawson, D.A., Girg, A., Hansson, B., Ljungqvist, M., Kempenaers, 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.
- O'Meally, D., Patel, H.R., Stiglec, R., Sarre, S.D., Georges, A., Marshall Graves, J.A., Ezaz, T. (2010): Non-homologous sex chromosomes of birds and snakes share repetitive sequences. *Chromosome Research* (18): 787-800.
- Otter, K., Ratcliffe, L., Michaud, D., Boag, P.T. (1998): Do female black-capped chickadees prefer high-ranking males as extra-pair partners? *Behavioral Ecology and Sociobiology* (43): 25-36.
- 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.
- Panov, E.N., Kostina, G.N., Galichenko, M.V. (1978): Organization of song in *Luscinia megarhynchos*. *Zoologicheskyy zhurnal* (57): 569-581.
- 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., 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., Møller, 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.
- Questiau, S., Eybert, M.C., Taberlet, P. (1999): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers reveal extra-pair parentage in bird species: the bluethroat (*Luscinia svecica*). *Molecular Ecology* (8): 1331-1339.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995): GenePop (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* (86): 248-249.
- 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): 2226-2231.
- Saladin, V., Bonfils, D., Binz, T., Richner, H. (2003): Isolation and characterization of 16 microsatellite loci in the Great Tit *Parus major*. *Molecular Ecology Notes* (3): 520-522.
- Shiue, Y.L., Millon, L.V., Skow, L.C., Honeycutt, D., Murray, J.D., Bowling, A.T. (2000): Synteny and regional marker order assignment of 26 type I and microsatellite markers to the horse X- and Y-chromosomes. *Chromosome Research* (8): 45-55.
- 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.

- Simeoni, M., Dawson, D.A., Gentle, L.K., Coiffait, L., Wolff, K., Evans, K.L., Gaston, K.J., Hatchwell, B.J. (2008): Characterization of 38 microsatellite loci in the European blackbird, *Turdus merula* (Turdidae, AVES). *Molecular Ecology Resources* (9): 1520-1526.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (2006): Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice. AVENTINUM, Praha.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research* (17): 6463-6471.
- Tiersch, T.R., Wachtel, S.S. (1991): On the evolution of genome size of birds. *Journal of Heredity* (82): 363-368.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* (22): 4673-4680.
- Todt, D. (1971): Equivalent and convalent vocal reaction of a nightingale (*Luscinia megarhynchos* L) with an extremely consistent song pattern. *Zeitschrift für vergleichende physiologie* (71): 262.
- Todt, D. (1998): Hierarchical learning of song in birds: A case of vocal imitation? *Behavioral and Brain Science* (21): 702.
- Veselovský, Z. (2001): *Obecná ornitologie*. Academia, Praha.
- Weber, J.L. & May, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* (44): 388-396.
- Weber, J.L. (1990): Informativeness of human (dC-dA)_n . (dG-dT)_n polymorphism. *Genomics* (7): 524-530.
- Williams, C.L., Brust, R.C., Fendley, T.T., Tiller, G. Jr., Rhodes, O.J. Jr. (2005): A comparison of hybridization between mottled ducks (*Anas fulvigula*) and mallards (*A. platyrhynchos*) in Florida and South Carolina using microsatellite DNA analysis. *Conservation Genetics* (6): 445-453.
- Wink, M. & Dyrce, A. (1999): Mating system in birds: A review of molecular studies. *Acta Ornithologica* (34): 91-109.
- Wu, C.P., Horng, Y.M., Wang, R.T., Yang, K.T., Huang, M.C. (2007): A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds. *Theriogenology* (67): 328-333.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3'UTR	- „3'untranslated region“, nepřekládaná oblast genu na 3'konci
5'UTR	- „5'untranslated region“, nepřekládaná oblast genu na 5'konci
AFLP	- „amplified fragment length polymorphism“, polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
dNTPs	- deoxyribonukleotidy
dRAMP	- „digested random amplified microsatellite polymorphism“
FIASCO	- „fast isolation by AFLP of sequences containing repeats“
ISSR	- „inter simple sequence repeat“, vnitřní jednoduché repetice
MP-PCR	- „microsatellite-primed PCR“
PAA gel	- polyakrylamidový gel
PCR	- „polymerase chain reaction“, polymerázová řetězová reakce
QTL	- „quantitative trait locus“, lokus pro kvantitativní znak
RAHM	- „random amplified hybridization microsatellites“
RAMP	- „random amplified microsatellite polymorphism“
RAMPO	- „random amplified microsatellite polymorphism“
RAPD	- „random amplified polymorphic DNA“, náhodná amplifikace polymorfní DNA
REMAP	- „retrotransposon microsatellite amplified polymorphism“, amplifikovaný polymorfismus mikrosatelit - retrotranspozon
RFLP	- „restriction fragment length polymorphism“, polymorfismus délky restričních fragmentů
rRAMP	- „reverse random amplified microsatellite polymorphism“
SAMPL	- „selective amplification of microsatellite polymorphic loci“, selektivní amplifikace mikrosatelitových polymorfních lokusů
SDS	- „sodium dodecyl sulfate“, dodecylsírany sodný
SNP	- „single-nucleotide polymorphism“, polymorfismus v jedné bázi
SSR	- „simple sequence repeat“, jednoduchá sekvenční repetice
STMS	- „sequence tagged microsatellites sites“
STR	- „simple tandem repeat“, jednoduchá tandemová repetice



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]