

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2011**

**Kateřina Buržáková**

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



**Analýza vybraných polymorfních *cross-species*  
mikrosatelitů pro determinaci paternity u  
pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a  
pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*)**

**Bakalářská práce**

**Kateřina Buržáková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2011**

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s pomocí uvedených literárních zdrojů pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D.

V Olomouci .....

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho odbornou pomoc, ochotu a čas, který mi věnoval jak při psaní bakalářské práce, tak při jejím praktickém provedení. Děkuji také kolegyním z Laboratoře populační genetiky i paní laborantce Mgr. Renatě Bílkové za cenné rady při provádění experimentů.

## Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů u pelikána bílého a skvrnozobého pomocí techniky *cross-species* PCR prostřednictvím primerů odvozených z DNA příbuzných druhů ptáků z řádu veslonozí, plameňáci, brodiví a vrubozobí, jejichž mikrosatelity nebyly dosud u pelikánů testovány.

U obou druhů bylo zvláště testováno 137 mikrosatelitových lokusů. U pelikána bílého bylo nalezeno 20 polymorfních mikrosatelitových lokusů, 19 z nich může být použito pro testování paternity, 1 byl kvůli velkému počtu *stutter* bandů nehodnotitelný, i když byl polymorfní. U pelikána skvrnozobého bylo nalezeno polymorfních lokusů 9. 7 z těchto lokusů se dá použít pro určování paternity, 2 jsou nehodnotitelné opět kvůli přítomnosti *stutter* bandů.

## **Summary**

This bachelor theses deals with finding of polymorphic microsatellite loci in Great White Pelican and Spot-billed Pelican through the use of technique cross-species PCR by primers derived from DNA of relative avian species of orders Pelecaniformes, Phoenicopteriformes, Ciconiiformes and Anseriformes, whose microsatellite loci haven't been tested yet.

Separately in both species was tested 137 microsatellite loci. In Great White Pelican were found 20 polymorphic loci, 19 of them can be used for paternity studies, 1 of them was unscorable due to a large number of stutter bands, although was polymorphic. In Spot-billed Pelican were found 9 polymorphic loci. 7 of them can be used for paternity studies, 2 of them are unscorable again because of the present of stutter bands.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled</b> .....	<b>9</b>
3.1	Řád veslonozí (Pelecaniformes) .....	9
3.1.1	Čeď pelikánovití (Pelecanidae) .....	10
3.1.2	Pelikán bílý ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> ) .....	12
3.1.3	Pelikán skvrnozobý ( <i>Pelecanus philippensis</i> ) .....	14
3.2	Mimopárové chování ptáků .....	16
3.3	Repetitivní DNA .....	17
3.3.1	Rozptýlené repetice .....	17
3.3.2	Tandemové repetice .....	18
3.4	Satelity .....	18
3.5	Minisatelity .....	18
3.6	Mikrosatelity .....	19
3.6.1	Velikost a dělení mikrosatelitů .....	19
3.6.2	Mutační mechanismy u mikrosatelitů .....	20
3.7	Hledání nových mikrosatelitových lokusů .....	21
3.8	Využití mikrosatelitů .....	22
3.8.1	Využití mikrosatelitů při studiu paternity .....	22
3.8.2	Využití mikrosatelitů v ornitologii .....	22
3.8.3	Studium polymorfních mikrosatelitů u pelikánů .....	23
3.8.3.1	PCR reakce .....	26
3.8.3.2	Elektroforetická separace PCR produktu .....	27
3.8.4	Problémy při hodnocení výsledků .....	27
3.8.4.1	Nulové alely .....	27
3.8.4.2	Stutter bandy .....	28
3.8.4.3	Alelová homoplazie .....	28
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>29</b>
4.1	Materiál .....	29
4.2	PCR amplifikace hledaných mikrosatelitových lokusů .....	29
4.2.1	Hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů pomocí <i>cross-species</i> amplifikace u pelikána bílého a skvrnozobého .....	30
4.2.2	Zpracování PCR produktů .....	33
4.3	Použité chemikálie .....	35
4.4	Použité roztoky .....	37
4.5	Laboratorní přístroje .....	39
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>Použitá literatura</b> .....	<b>52</b>

# 1 Úvod

Mikrosatelity jsou jedny z nejpoužívanějších markerů v molekulární biologii. Jsou to krátké tandemové repetice o velikosti motivu 1-6 párů bazí vyskytující se v genomech prokaryotických i eukaryotických organismů. Tyto markery se využívají v populačních a paternitních studiích. Jsou variabilní a kodominantní, mají vysoký alelový polymorfismus a snadno mutují, čehož se využívá právě při determinaci paternity.

U pelikána skvrnozobého již byly popsány mikrosatelitové lokusy v bakalářské práci Mikulová (2008), kdy byly testovány mikrosatelity od vybraných druhů z řádu veslonozí, brodiví a potápky. V diplomové práci Mikulová (2010) byly u pelikána bílého i skvrnozobého testovány primery odvozené od různých druhů z řádů veslonozí, plameňáci, brodiví, vrubozobí, tučňáci, dlouhokřídli i sudokopytníci. U pelikána bílého bylo nalezeno 39 polymorfních mikrosatelitových lokusů, u pelikána skvrnozobého 31 polymorfních mikrosatelitových lokusů, které byly navrženy pro determinaci paternity.

V mé bakalářské práci pokračuji v hledání mikrosatelitových lokusů u pelikána bílého a skvrnozobého prostřednictvím metody *cross-species* amplifikace, kdy zkouším dosud netestované mikrosatelity, které byly polymorfní u příbuzných druhů ptáků.



## 2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů s využitím *cross-species* primerů, které jsou známy od taxonomicky příbuzných druhů ptáků a které dosud nebyly u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) ani pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) testovány.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Řád veslonozí (Pelecaniformes)

Do řádu veslonozí se systematicky řadí 5 čeledí. Nejznámější je čeleď Pelecanidae, do níž patří všeobecně známí pelikáni. Dále čeleď faetonovití (Phaetonidae), terejovití (Sulidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae), kteří zahrnují kormorány i anhingy a fregatkovití (Frigatidae) (Schreiber, 1994). Naopak podle Nelsona (2005) je řád veslonozí rozdělen do šesti čeledí, kdy se anhingy neřadí do čeledi kormoránovití (Phalacrocoracidae), ale tvoří vlastní čeleď anhingovití (Anhingidae). Veslonozí jsou považováni za parafyletický nebo polyfyletický taxon, přestože mají společné morfologické a behaviorální synapomorfie. Molekulární studie ukázaly, že mezi veslonohé patří také fylogeneticky člunozobec (*Balaeniceps*) a kladivouš (*Scopus*). Monofyletickou skupinu vytvářejí terejové, kormoráni a anhingy (Gaisler *et* Zima, 2007).

Do řádu veslonozí patří velcí vodní ptáci s veslovací nohou, která má všechny čtyři prsty spojené plovací blánou (Gaisler *et* Zima, 2007), což je považováno za hlavní znak vyskytující se u všech zástupců jinak velice odlišných skupin tohoto řádu. Zobák mají mohutný a hluboce rozeklaný s menším nebo větším holým hrdelním vakem, který se nachází pouze u pelikánů a samců fregatek, u faetonů zcela chybí (Schreiber, 1994). Jejich jazyk je silný, jícen roztažitelný, žaludek třídlý. Mají kostrční žlázu, redukované nozdry a chybí jim vomer (Gaisler *et* Zima, 2007). Tělo těchto ptáků je nepřetržitě zásobováno kyslíkem díky systému vzdušných vaků. Okysličený vzduch prochází plicemi při nádechu i při výdechu. Odbočky vyplňují velkou část hrudního koše i spodní partie krku, kde vytvářejí měkké polštáře, u nichž se předpokládá, že slouží k tlumení nárazu na vodní hladinu u druhů, které se vrhají střemhlav do vody. Např. faetoni a terejové (Schreiber, 1994).

Zástupci řádu veslonozí jsou primárně mořští ptáci (Gaisler *et* Zima, 2007), ale najdeme je i na jezerech, bažinách a řekách (Schreiber, 1994). Někteří veslonozí např. pelikáni se mohou přesouvat ze sladké vody na slanou a zase zpět kvůli hnízdění (Gaisler *et* Zima, 2007). Např. pelikán severoamerický hnízdí na pevnině a mimo dobu hnízdění migruje na mořské pobřeží. Většina druhů tohoto řádu žije v tropickém, subtropickém a mírném pásu, ovšem některé druhy kormoránů a terejů dávají přednost antarktickým a subantarktickým vodám (Schreiber, 1994).

Veslonozí se mohou dožít vysokého věku, ve volné přírodě nad 20 let. Skoro všechny druhy hnízdí v koloniích, hnízda jsou u terejů i kormoránů vzdálena jen několik centimetrů. Mnoho jedinců hnízdí každý rok na stejném místě, kde se páří se stejným partnerem. Pro všechny druhy platí, že oba rodiče sedí na vejcích a starají se o vylíhlá mláďata. Inkubace vajec trvá 4-7 týdnů. Mláďata jsou holá kromě faetonů, jejichž mláďata jsou po vyklubání pokryta šedým chmýřím. Prachové peří jim naroste za 3 týdny. Mláďata jsou krmena přímo ze zobáku rodiče, polykají již natrávenou potravu (Schreiber, 1994).

Veslonozí se živí převážně rybami, ale svůj jídelníček mohou obohatit i bezobratlými živočichy, např. sépiemi. Mohou žrát i vajíčka a mláďata jiných ptáků (Schreiber, 1994). Způsob, jakým se zmocňují kořisti, se projevuje v celkovém utváření těla (Hanzák *et* Hudec, 1974). Různé čeledi z řádu veslonozí mají odlišné techniky lovu ryb. Phalacrocoracidae a Anhingidae se pro potravu potápějí, pro Sulidae a Phaethonidae je typický střemhlavý pád do vody, Pelecanidae zase natlačují ryby na mělčiny a sbírají je z vodní hladiny. Fregatidae ryby sbírají také z hladiny, popřípadě paraziticky od jiných ptáků (Gaisler *et* Zima, 2007).

Veslonozí jsou důležití také hospodářsky, jelikož produkují obrovské množství guána, které tvoří v oblastech u pobřeží Jižní Ameriky chilský ledek (Gaisler *et* Zima, 2007). Hlavní rod tvořící guáno jsou kormoráni, kteří vytvářejí nejpočetnější kolonie mořských ptáků na světě. Guáno je těženo a využíváno jako kvalitní hnojivo (Schreiber, 1994).

### 3.1.1 Čeleď pelikánovití (Pelecanidae)

Podle del Hoya *et al.* (1992) tato čeleď zahrnuje 7 druhů pelikánů, pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*), pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*), pelikána australského (*Pelecanus conspicillatus*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*) a pelikána hnědého (*Pelecanus occidentalis*). Podle <http://en.wikipedia.org/wiki> se k těmto 7 druhům řadí také osmý druh, pelikán chilský (*Pelecanus thagus*). Gosler (1994) zařazuje do této čeledi ještě pelikána menšího (*Pelecanus roseus*).

Jsou to mohutní, těžcí ptáci, na souši neohrabaní, ale obratní v lovu ryb. Zobák mají velmi dlouhý, na konci mírně zahnutý. Spodní čelist je složena ze dvou tenkých a

ohebných větví, které jsou na špičce spojené. Mezi nimi visí široký a roztažitelný vak (Hanzák *et* Hudec, 1974). Tito ptáci měří od 127 do 170 cm a jejich hmotnost se pohybuje v rozmezí 2,5 až 15 kg (Gosler, 1994). Barva peří je u pěti ze sedmi druhů bílá. Zbylé dva druhy mají barvu tmavší. Pelikán skvrnozobý je světle šedý s černým prachovým peřím, pelikán hnědý barvu svého peří mění. Několik měsíců má stříbřitě šedá záda, černé břicho, bílou hlavu a krk. Zbytek roku má žlutou hlavu a čokoládově hnědý krk, vak může být zbarven různě. Ke změně těchto dvou typů zbarvení dochází v závislosti na stadiu hnízdění (Schreiber, 1994). Všechny druhy mají křídla dlouhá a široká, jejich rozpětí se pohybuje od 2 do 2,5 m (Gosler, 1994). Za letu tvoří také pravidelná hejna, ve kterých dokáží synchronizovaně plachtit (Svensson *et* Grant, 2004).

Pelikáni žijí v tropickém i mírném pásu obou polokoulí, neobývají pouze Nový Zéland, Oceánii a východ Jižní Ameriky (Hanzák *et* Hudec, 1974). Hnízdí převážně v blízkosti sladkých vod, kde shánějí potravu. Jsou schopni hnízdit i ve slaných vodách (Schreiber, 1994). Žijí tedy v oblastech velkých vnitrozemských jezer a u ústí velkých řek (Hanzák *et* Hudec, 1974). Pelikán hnědý je jediným druhem pelikána, který se dokáže za potravou vrhnout střemhlav do vody. Ryby loví pouze v moři. Může se živit také mršinami v okolí rybářských lodí. Ostatní druhy loví ryby společně v hejnech. Zobák s roztaženým vakem ponoří pod vodu a ryby zaženou na mělčinu, kde je snadno chytají (Schreiber, 1994).

Zásnubní rituály jsou tvořeny vizuálními signály a gesty, protože dospělí ptáci nejsou schopni vydávat žádné zvuky na rozdíl od mláďat (Schreiber, 1994). Chybí jim totiž syringeální svaly (del Hoyo *et al.*, 1992). Místo k hnízdění v kolonii, kde se počet jedinců může pohybovat od pěti do tisíců párů, vybírá samec. Pohyby hlavy a krku láká přeletující samice. Samec s přilákanou samicí provozuje zásnubní rituál a poté dojde ke spáření. Samice začne stavět hnízdo z materiálu, který jí přinese samec. Hnízda staví z větví, na zemi nebo na stromech (Schreiber, 1994). Pelikán severoamerický, bílý a kadeřavý hnízdí na zemi v rákosinách, křovinách i na volném prostranství (Hanzák *et* Hudec, 1974). Pelikán africký a skvrnozobý hnízdí na stromech, pelikán hnědý může hnízdit na stromech i na zemi (Schreiber, 1994). Do hnízda samice klade 2 až 4 modrobílá vejce, na kterých sedí oba partneři po dobu 30 až 37 dní. Mláďata se rodí holá, jejich zobák není zatím dlouhý ani silný ve srovnání s velikostí těla. Zmohutní, až mláďatům začne růst prachové peří. Rodiče je krmí natrávenými rybami, které si mláďata loví z vaku rodičů (Hanzák *et* Hudec, 1974). Vychovávají je 50 až 70 dní

(Gosler, 1994), ale pohlavní dospělosti dosahují až po několika letech (Hanzák *et* Hudec, 1974).

#### **Systematické zařazení rodu pelikán (Gaisler, 1983)**

říše:	živočišná (Animalia)
kmen:	strunatci (Chordata)
podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
třída:	ptáci (Aves)
nadřád:	letci (Neognathae)
řád:	veslonozí (Pelecaniformes)
čeleď:	pelikánovití (Pelecanidae)
rod:	pelikán ( <i>Pelecanus</i> )

#### **3.1.2 Pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*)**

Pelikán bílý, jinými názvy velký evropský pelikán nebo pelikán růžový (Nelson, 2005) je jedním z nejznámějších druhů pelikánů. Je velký jako labuť a létá s hlavou položenou na zádech (Černý, 1980). Dospělý jedinec má bílé peří zesponu s černými letkami (viz obrázek 1), které v době hnízdění získává žltorůžový nádech. Vak je šedavě žlutý, barva duhovky tmavá a kolem očí se nachází masově zbarvená lysina, která při hnízdění zoranžoví (Svensson *et* Grant, 2004). Ve svatebním šatě má samec i samice také krátkou chocholku v týle. Na rozdíl od jiných druhů má červené nohy (Hanzák *et* Hudec, 1974). Samci pelikána bílého měří s nataženým krkem až 175 cm, jejich hmotnost se pohybuje v rozmezí 9 až 15 kg, samice jsou o něco menší, měří 148 cm a váží 5 až 9 kg. Rozpětí křídel je 226 až 360 cm (del Hoyo *et al.*, 1992). V letu střídá plachtění a pomalé údery křídel. Létá v liniích nebo v šiku tvaru V (Gosler, 1994). Zobák je dlouhý 43 až 45 cm (Hanzák *et* Hudec, 1974). Nejvyšší zjištěný věk u pelikána bílého je 51 let (Veselovský, 2001).



**Obrázek 1:** Pelikán bílý za letu

Zdroj: <http://www.wildafrika.cz/cs/zvire/pelikan-bily/>

Pelikán bílý hnízdí v západních oblastech Asie, na ostrovech Perského zálivu, v tropické Africe. V Evropě hnízdí pravidelně v Rumunsku, Bulharsku a na březích Azovského moře. V jiných oblastech Evropy hnízdí jen výjimečně. Před 300 lety hnízdil i na Třeboňsku (Hanzák *et* Hudec, 1974). Vyhledává sladkou vodu jezer, jezírek a brakickou vodu delt řek (del Hoyo *et al.*, 1992). Nejblíže od nás hnízdí v deltě Dunaje (Černý, 1980; Gaisler *et* Zima, 2007), kde jich bývá pozorováno 3000 párů (Anonymous, 2006). Hnízdo je tvořeno hromadou sneseného rákosu a měří v průměru 1,5 m. Na vejcích sedí samice, samec ji střídá ráno a večer, aby se mohla nakrmit. Po 33 dnech se z vajec líhnou 3 až 4 mláďata (Hanzák *et* Hudec, 1974). Podle del Hoya *et al.* (1992) klade průměrně dvě vejce, jejichž inkubace trvá 29 až 36 dní. Vejce samice snáší ve dvoudenních intervalech a zahřívá je už od prvního sneseného vejce. Kvůli tomu je ve velikosti mláďat značný rozdíl. Mláďata jsou krmena dvakrát denně (Hanzák *et* Hudec, 1974), jako opeřenější jsou hnědě skvrnitá (Černý, 1980) a odváží se na vodu, kde je rodiče krmí. Ve stáří dvou a půl měsíce už mohou létat (Hanzák *et* Hudec, 1974). Dospívají ve třech až čtyřech letech. Pelikán bílý patří mezi stěhovavé ptáky, od září do listopadu odlétá z dunajské delty (del Hoyo *et al.*, 1992) nejčastěji do východní Afriky. Ze severovýchodní Evropy míří na indický subkontinent (Nelson, 2005).

Jako všechny ostatní druhy pelikánů se živí hlavně rybami. V Evropě jsou to kapři, v Číně parmice, v Indii loví kaprovité ryby rodu *Cyprinodon*, v Africe cichlidy. Ryby představují 90 % potravy. Může se živit také vajíčky nebo mláďaty kormoránů. Denně sežere 900 až 1200 g potravy. Ryby loví ve skupinách, samostatně jen v případě nutnosti (del Hoyo *et al.*, 1992).

Není globálně ohroženým druhem. Jeho počet ale během předminulého století v palearktické oblasti, tedy v Evropě, střední a severní Asii a v severní Africe, poklesl. Dnes je považován za regionálně ohrožený druh. Palearktické populace se odhadují na 7300 – 10500 párů ve 23 – 25 koloniích (del Hoyo *et al.*, 1992). U nás je chován v ZOO Zlín, kdy bylo v roce 2009 odchováno 11 mláďat těchto ptáků. Dále pelikána bílého chová ZOO Praha, ZOO Hradec Králové, ZOO Liberec, ZOO Plzeň a ZOO Jihlava.

### **3.1.3 Pelikán skvrnozobý (*Pelecanus philippensis*)**

Pelikán skvrnozobý, dalšími názvy pelikán filipínský nebo pelikán šedý (Nelson, 2005) byl dříve rozšířen v celé jižní Asii. Dnes obývá spíše severovýchodní Indii a Srí Lanku, Indonésii a východ Sumatry (del Hoyo *et al.*, 1992).

Pelikán skvrnozobý je na rozdíl od pelikána bílého menší, samec může mít velikost 127 až 152 cm, samice je ještě menší. Jeho hmotnost se pohybuje okolo 5 kg. Je ze všech pelikánů nejmenší (del Hoyo *et al.*, 1992). Má stříbřitě šedá záda a načernalé prachové peří. Na břichu má peří bělejší, ruční letky hnědočerné, na lopatkách šedohnědé (viz obrázek 2). Pod křídly a ocasem je peří narůžovělé (Nelson, 2005). Má tmavě hnědé nohy, někdy šedavě zbarvené. Když nehnízdí, barva peří a chocholka je méně výrazná, kůže na hlavě je šedavě žlutá. Mladí a nehnízdící ptáci mají nohy šedé a jsou hnědší (del Hoyo *et al.*, 1992; Gosler, 1994). Na rozdíl od pelikána bílého má hluboce skřehotavý hlas (Gosler, 1994).



**Obrázek 2:** Pelikán skvrnozobý za letu

Zdroj: <http://www.naturfoto.cz/pelikan-skvrnozoby-fotografie-3754.html>

Mimo hnízdní období se drží na velkých řekách a potocích (Gosler, 1994). Lze jej zahlédnout v bažinách, u ústí řek, na přehradách, zatopených polích, na jezerech, slepých ramenech řek, podél pobřeží. Pro hnízdění vyhledávají velké široké stromy v bažinatých lesích nebo savanách, na kterých také spí. Někdy hnízdí na okrajích rýžových polí, kde není rušen. Na 1 stromě se může nacházet 3 až 15 hnízd, často hnízdí společně s kormorány, čápy nebo volavkami. Snáší 3 až 4 vejce, inkubační doba je 30 dní. Mláďata se rodí holá, peří je zprvu sněhově bílé (del Hoyo *et al.*, 1992), úplně jim naroste za 60 až 90 dní (Gosler, 1994). Skvrny na zobáku se objevují po jednom roce života, zbarvení peří dospělých dosahují ve třetím roce (Anonymous, 2009). Ve věku 12 týdnů jsou už nezávislí, ale hnízdo opouštějí až ve stáří 4 až 5 měsíců (Gosler, 1994).

Živí se převážně rybami, za den jich spořádá až 1 kg. Na rozdíl od pelikána bílého, který loví ve skupinách, pelikán skvrnozobý loví většinou sám, skupinově pouze občas (del Hoyo *et al.*, 1992). Podle Nelsona (2005) občas uloví i ještěrku, hada nebo žábu.

Podle del Hoya *et al.* (1992) je pelikán skvrnozobý zastoupen v nejmenším počtu ve srovnání s ostatními druhy pelikánů. V roce 1990 bylo napočítáno 4245 ptáků v Indii a na Srí Lance. A kolem 2200 v Assamu. O rok později bylo v Assamu napočítáno 114 ptáků a na Srí Lance 3010. Počet nejspíš poklesl kvůli znečištění pesticidy, lovem a zničením životního prostředí. V jižní Indii vesničané chrání hnízdící pelikány, kteří následkem toho nejsou tak plaší. Podle Nelsona (2005) je pelikán skvrnozobý



považován za nejohroženější druh pelikána. Pokles je velký i přes ochranu těchto ptáků v národních parcích. Dnes je zařazen v Červené knize ohrožených ptačích druhů. Poslední odhady jeho početnosti se pohybují kolem 3500 ptáků (Anonymus, 2009). Pelikáni skvrnozobí jsou v České republice chováni ve dvou zoologických zahradách, v ZOO Zlín a v ZOO Dvůr Králové nad Labem, kde se úspěšně rozmnožují.

### 3.2 Mimopárové chování ptáků

Ptáci jsou typičtí různými druhy partnerství, jejich sociální párový systém je velmi rozmanitý (Petrie *et* Kempnaers, 1998). Mohou žít v monogamním i v polygamním svazku nebo se dokonce chovat promiskuitně. Uvádí se, že v monogamním svazku žije až 97 % ptáků (Veselovský, 2001).

Aplikace molekulárně genetických technik způsobila revoluci v pohledu na partnerské svazky ptáků. Předchozí domněnka, že jsou ptáci převážně monogamní, byla vyvrácena (Petrie *et* Kempnaers, 1998). Genetická monogamie (0 % EPP) byla potvrzena u méně než 25 % sociálně monogamních druhů. Při studiu vrabců byla monogamie zjištěna pouze ve 14 % případů (Griffith *et al.*, 2002). Ptáci jsou tedy monogamní jen velice vzácně (Petrie *et* Kempnaers, 1998).

Přibližně u 90 % druhů se vyskytují mimopároví potomci, kteří jsou výsledkem mimopárové paternity (EPP). To znamená, že se o mláďata stará samec, který není jejich biologickým otcem. Procento mimopárové paternity se může u různých druhů lišit (Griffith *et al.*, 2002). U některých ptačích druhů mimopárová paternita úplně chybí nebo se vyskytuje jen ve velice malém procentu. Příkladem je buřňák lední (*Fulmarus glacialis*) (Petrie *et* Kempnaers, 1998). Zatímco strnad rákosní (*Emberiza schoeniclus*) patří mezi druhy, u kterých se mimopároví potomci vyskytují v 55 % případů (Griffith *et al.*, 2002). Rozdíly v EPP jsou výrazné také u druhů patřících do stejného rodu. Bylo zjištěno, že 36 % potomků rákosníka ostřicového (*Acrocephalus paludicola*) byli mimopároví potomci. Zatímco rákosník velký (*Acrocephalus arundinaceus*) měl pouze 3,4 % mimopárových mláďat. Rozdíly ve frekvenci EPP se mohou objevit také mezi různými populacemi stejného druhu. Např. EPP u budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*) byla v jedné populaci nulová, ale v jiné 50 %. U vlhovce červenokřídlého (*Agelaius phoeniceus*) se procento výskytu EPP během pěti let dvakrát zvýšilo (Petrie *et* Kempnaers, 1998).

Samice vyhledávají EPP z mnoha různých důvodů. Prvním důvodem může být zabránění případné neplodnosti svého sociálního partnera. Samice neplodnost zjistí

podle samcového fenotypu, nebo ji zjistit nedokážou. V obou případech samice vyhledávají EPP, aby si zajistily potomky. Dalším důvodem, proč samice vyhledávají EPP, je zdůraznění genetické diverzity nebo kompatibility mezi jejich potomky. Uvádí se také, že samice vyhledávají EPP, aby pro své potomky získaly dobré geny. Kvalitu genů samce mohou samice odhadnout podle jeho fenotypu (Griffith *et al.*, 2002).

### 3.3 Repetitivní DNA

Genomy organismů se skládají z jedinečných úseků obsahujících geny a z úseků repetitivních. Hustota genů se stoupající složitostí eukaryotických organismů klesá, protože genomy vyšších organismů obsahují velké množství repetitivní DNA, která zahrnuje rozptýlené a tandemové repetice (Snustad *et Simmons*, 2009), které často projevují zřetelnou nestabilitu a dynamiku (Ramel, 1997).

#### 3.3.1 Rozptýlené repetice

Rozptýlené repetitivní sekvence jsou zastoupeny v genomech jednotlivých organismů v různém počtu párů bazí. Důsledkem toho se velikost genomů u různých organismů řádově liší. V některých eukaryotických genomech jako např. v genomu *Drosophily* se rozptýlené repetice vyskytují jen v několika procentech. Naopak u jiných druhů organismů představují až 90 % genomu. Je tomu tak např. u cvrčků, lilií nebo měňavek. U člověka představují 50 % genomu (Gibson *et Muse*, 2009).

Nejrozšířenější z repetitivních sekvencí DNA jsou transponovatelné elementy (transpozony), které se mohou přemisťovat v rámci jednoho chromozomu nebo dokonce z jednoho chromozomu na druhý (Snustad *et Simmons*, 2009). Transpozony se dělí na DNA transpozony, LINEs, SINEs a retroviry. DNA transpozony se přemisťují tak, že využívají enzym transpozázu, který katalyzuje vystřížení a vložení elementu do jiného místa genomu. Tato kategorie zahrnuje P-elementy *Drosophily*, bakteriální IS a kvasinkové Ty elementy. Zbýlé tři kategorie se přemisťují prostřednictvím enzymu reverzní transkriptázy, který elementy tvořené RNA přepíše do DNA. Jde o samostatně transponovatelné LINEs elementy velké do 8 kb, neautonomní SINEs, dlouhé několik stovek bazí, které jsou na LINEs závislé, jelikož používají pro svůj přenos jejich reverzní transkriptázu. Nakonec zde patří retroviry, které jsou dlouhými terminálními repetitivními elementy (LTR elementy) (Gibson *et Muse*, 2009).

### 3.3.2 Tandemové repetice

Tandemové repetice mají základní jednotku opakování umístěnou přímo za sebou. Tyto repetice s největším počtem kopií v eukaryotních genomech nekódují proteiny a nepodléhají ani transkripci. Pokud mají repetitivních jednotek méně, mohou některé proteiny kódovat. Např. ribozomální proteiny nebo proteiny aktinu a myozinu. Mezi tandemové repetice se mimo telomer a centromer řadí satelity, minisatelity a mikrosatelity, souhrně označovány jako satelitní DNA (Snustad *et* Simmons, 2009). Ramel (1997) uvádí, že rozšíření trinukleotidových mikrosatelitových sekvencí je spojeno s různými závažnými nemocemi, jako je např. syndrom fragilního X nebo Huntingtonova choroba. Naopak u vzácných alel minisatelitů bylo zjištěno, že jsou asociované s onkogeny, což vede k zvýšenému riziku výskytu různých rakovinových onemocnění. Dynamické chování repetitivních sekvencí se týká také telomer (Ramel, 1997), jejichž tandemové repetice se mohou lišit u různých druhů organismů (Snustad *et* Simmons, 2009). Při buněčném dělení chrání konce chromozomů před ztrátou kódujících sekvencí. Telomery jsou udržovány enzymem telomerázou, který u somatických buněk ztrácí svou aktivitu a buňky tak postupně umírají. Rakovinné buňky mají aktivovanou telomerázu a stávají se nesmrtelnými (Ramel, 1997).

### 3.4 Satelity

Satelity jsou tandemové repetice s délkou základního motivu až 5 Mbp (Amour *et al.*, 1999). Weising *et al.* (2005) uvádějí, že nejčastější délka repetitivní jednotky je 100 až 300 bp a jejich počet se pohybuje mezi 1000 až 100000. Satelity se jako markery v molekulární biologii dnes téměř nepoužívají.

### 3.5 Minisatelity

Repetitivní jednotka minisatelitů má velikost 10-100 párů bazí (Ramel, 1997; Buschiazzi *et* Gemmell, 2006). Nejvíce jsou zastoupeny v počtu kolem 9 až 30 bp. Počet těchto lokusů je v lidském haploidním genomu odhadován na 1500 (Ramel, 1997). Obecně minisatelity tvoří hypervariabilní oblast genomu obratlovců, rostlin a hub. V této oblasti se nachází vlastní minisatelit, který je obklopen jedinečnými sekvencemi DNA (Zima *et al.*, 2004). Minisatelity jsou primárně lokalizovány na koncích chromozomů v subtelomerických oblastech, což souvisí s vysokou hustotou chiasmat během meiózy. Krátké uspořádání repetice může být stabilní miliony let, zatímco dlouhé alely mohou mít extrémně vysokou frekvenci mutačních změn. Proto mutační frekvence

minisatelitů nezávisí na délce alely tak, jako u mikrosatelitů (Ramel, 1997). Proměnlivost minisatelitů je způsobena vysoce variabilním a rozdílným počtem jednotek, nikoli substitucemi bází (Zima *et al.*, 2004; Weising *et al.*, 2005). Mutační změny nejsou náhodně rozložené, ale vyskytují se převážně na jednom konci lokusu. Většina těchto lokusů vykazuje extrémní polymorfismus, zapříčiněný změnami v počtu repetice (Ramel, 1997). Minisatelity jsou markery využívány v genetickém fingerprintingu (Brown, 2007) nebo při určování paternity (Weising *et al.*, 2005).

### 3.6 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou jednoduché tandemové repetice DNA více nebo méně zastoupené v genomech každého prokaryotického a eukaryotického organismu (Chambers *et MacAvoy*, 2000; Zane *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006) přítomné v kódujících i nekódujících oblastech (Zane *et al.*, 2002). Nejvíce se vyskytují zejména u mnohobuněčných organismů (Ramel, 1997). Důležitost získaly během minulého století, kdy je vědci shledali pozoruhodnými markery pro molekulární biologii (Chambers *et MacAvoy*, 2000). Jsou označovány jako krátké tandemové repetice (short tandem repeats, STRs) (Brown, 2007) nebo jako jednoduché repetitivní sekvence (simple sequence repeats, SSRs) (Tóth *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006). Spolu s minisatelity patří do skupiny genomických sekvencí známých pod názvem variabilní počet tandemových repeticí (*Variable Number of Tandem Repeat, VNTRs*) (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006). Jsou všeobecně používanými genetickými markery. Jejich specifickou vlastností je to, že podléhají mutacím ve větším měřítku než zbytek genomu (Oliveira *et al.*, 2006).

#### 3.6.1 Velikost a dělení mikrosatelitů

Mikrosatelity zahrnují tandemové kopie dvou, tří, čtyř nebo pětinukleotidových repetitivních jednotek (Brown, 2007; Snustad *et Simmons*, 2009). Podle Ramela (1997) je velikost repetitivního motivu 2 až 4 jednotky. Naopak Oliveira *et al.* (2006) uvádějí, že se velikost repetitivní jednotky pohybuje od 1 do 6 páru bází. Každá repetice se může opakovat 5 – 20krát. V lidském genomu je nejméně 650000 STRs (Brown, 2007).

Mikrosatelity se dělí podle počtu repetice na mononukleotidové, dinukleotidové, trinukleotidové, tetranukleotidové, pentanukleotidové a hexanukleotidové. U mononukleotidových repetice jsou obecně u druhů poly A/T úseky více zastoupeny než poly C/G úseky. SSRs s dinukleotidovým repetitivním motivem jsou u většiny druhů

zastoupeny v 48-67 % (Wang *et al.*, 1994). U všech členovců a obratlovců je nejvíce frekventovaný motiv AC. Repetice CG se vyskytuje jen vzácně, např. v kódující oblasti je známa 16 bp repetice CG, která kóduje beta adrenergní receptor u *Canis familiaris*. U vyšších rostlin, kvasinek a hub jsou nejčastější dinukleotidové repetice AT. Trinukleotidové repetice jsou obecně u všech taxonů nejvíce zastoupeny v motivech ACG a ACT. Patří k nejzajímavějším, jelikož hrají velkou roli v mnoha lidských degenerativních chorobách (syndrom fragilního X, Huntingtonova choroba, myotická dystrofie, bulbospinální muskulární atrofie a dědičná rakovina tlustého střeva) (Tóth *et al.*, 2000). Nejčastějšími tetranukleotidovými repeticemi jsou ty, které obsahují G a C báze. U pentanukleotidových repetic jsou časté sekvence AAAAC nebo AAAAT. Hexanukleotidové repetice jsou druhým nejrozšířenějším typem repetic v exonech po trinukleotidových repeticích. U primátů, rostlin a kvasinek jsou bohaté na A a T báze. Nejčastější repeticí je AACCT, shodná s telomerovým motivem (Tóth *et al.*, 2000).

Mikrosatelity jsou klasifikovány podle typu repetitivní jednotky, jako úplné, neúplné, přerušené nebo složené. V úplném (*perfect*) mikrosatelitu není repetitivní sekvence přerušena jinou bází, která do motivu nepatří (např. TATATATATATATA), zatímco v neúplném (*imperfect*) mikrosatelitu se nachází báze navíc, která opakuje se jednotky přerušuje (např. TATATATACTATATA). V případě přerušeného mikrosatelitu se v opakované sekvenci nachází malá odlišná sekvence, která neodpovídá repetitivnímu motivu (např. TATATACGTGTATATATA). Naopak složený mikrosatelit obsahuje dvě sousední odlišné opakuje se sekvence (např. TATATATATAGTGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

Díky jejich vysoké mutabilitě mají mikrosatelity významnou roli v evoluci genomu utvářením a zachováváním kvantitativní genetické variace (Tóth *et al.*, 2000).

### 3.6.2 Mutační mechanismy u mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou v některých případech až extrémně nestabilní (Ramel, 1997). Jsou považovány za polymorfní markery, protože snadno podléhají spontánním mutacím, čímž ztrácejí nebo získávají určitý počet repetitivních jednotek. Mezi dva základní mutační mechanismy patří replikační sklouznutí DNA polymerázy a interchromozomální výměna (Buschiazzi *et Gemmel*, 2006).

Sklouznutí DNA polymerázy je hlavním mechanismem, díky kterému se mikrosatelity stávají variabilními. DNA polymeráza při replikaci sklouzne, což vede k tomu, že se obě vlákna vzájemně posunou a poté chybně spojí (Buschiazzo *et* Gemmel, 2006). Při následující replikaci dojde k inzerci nebo delecii repetitivních jednotek (Ellegren, 2004). K sklouznutí může dojít také při opravách DNA (Ramel, 1997). Většina těchto sklouznutí má za následek 63-65 % bodových mutací (Buschiazzo *et* Gemmel, 2006).

Druhý mechanismus mutací, interchromozomální výměna, spočívá v rekombinaci nebo v nerovnoměrném crossing overu. Každý z nich může způsobit zkrácení nebo rozšíření kopií základního motivu. Působení rekombinace má daleko větší vliv na variabilitu minisatelitů než mikrosatelitů (Buschiazzo *et* Gemmel, 2006).

Především na CG bohaté trinukleotidy a CA dinukleotidové repetice vykazují vysokou nestabilitu a jsou variabilnější než ostatní typy repetice. Důvod není znám (Ramel, 1994).

### **3.7 Hledání nových mikrosatelitových lokusů**

Existují dva způsoby, jakými lze najít nové mikrosatelitové lokusy. Buď je lze získat *de novo*, kdy se izolují z genomové knihovny daného druhu (Zane *et al.*, 2002) nebo metodou *cross-species* PCR, kdy jsou mikrosatelity získávány pomocí PCR reakce s použitím primerů od příbuzných druhů (Primmer *et al.*, 2005).

U hledání mikrosatelitů *de novo* je kvalitně izolovaná DNA zkoumaného druhu naštipána na fragmenty restrikčními enzymy nebo ultrazvukem (Zane *et al.*, 2002). Nejčastěji bývají použity restrikční enzymy *RsaI* a *BstUI* (Glenn *et* Schable, 2005). Výběr restrikčního enzymu závisí na požadovaných délkách fragmentů DNA a na typu konců restrikčních fragmentů, které mohou být lepivé nebo tupé. Fragmentovaná DNA je poté rozdělena podle velikosti pomocí gelové elektroforézy. Použity jsou malé fragmenty o velikosti 300-700 bp, které jsou vloženy do plazmidového vektoru buď přímo nebo po spojení se specifickými adaptory. V tomto kroku může dojít k získání nízkého počtu rekombinantů, nebo k nežádoucímu vytvoření spojů mezi restrikčními fragmenty. Plazmid je poté vložen do kompetentních bakteriálních buněk. Tato transformace poskytuje tisíce rekombinantních klonů, které jsou následně prověřovány, zda-li obsahují sekvenci mikrosatelitů. Třídění pozitivních klonů je provedeno prostřednictvím Southern blotu a následné hybridizace se značenou probou. Pozitivní klony jsou namnoženy a sekvenovány. Primery jsou navrženy podle jedinečných

sekvencí, které daný mikrosatelit ohraničují. Tento způsob hledání mikrosatelitových lokusů je poměrně drahý a časově náročný (Zane *et al.*, 2002).

*Cross-species* PCR amplifikace není technikou tak časově náročnou jako izolace mikrosatelitů *de novo*. Je i poměrně levnější, a proto daleko více využívanější. Mikrosatelitové lokusy nejsou hledány přímo v DNA daného druhu. Pro *cross-species* PCR jsou použity primery od fylogeneticky příbuzných druhů, u kterých ohraničují již nalezené polymorfní mikrosatelitové lokusy. Tato metoda zkouší, jestli se mikrosatelity nalezené u příbuzných druhů budou nacházet v genomu námi studovaného druhu, a pokud ano, zda budou polymorfní (Primmer *et al.*, 2005).

### **3.8 Využití mikrosatelitů**

Mikrosatelity jsou nejrozšířenějšími aplikovanými molekulárními markery používanými v genetických studiích. Používají se u paternitních testů (Oliveira *et al.*, 2006), pro identifikaci pohlaví a osob, k určení biologické historie populací (Chambers *et McAvoy*, 2000). Slouží také k přesnějšímu mapování genomu, jelikož se vyskytují ve větším počtu alelických forem na rozdíl od dvou alel u RFLP (Brown, 2007). Jsou tedy cenné při konstrukci map eukaryotických chromozomů o vysoké hustotě. Důvodem takového rozsahu aplikací mikrosatelitů je to, že jsou kodominantní a mnohoalelové, jejich analýza je vysoce reprodukovatelná s velkou rozlišovací schopností (Oliveira *et al.*, 2006).

#### **3.8.1 Využití mikrosatelitů při studiu paternity**

Mikrosatelity jsou molekulární markery s vysokým alelovým polymorfismem. Jsou somaticky stabilní, vysoce variabilní a kodominantní. Díky vysokému počtu alel a jejich kodominanci se dají tyto markery dobře využít pro určování paternity. Frekvence vzniku mutací je tak vysoká, aby alelový polymorfismus zůstal zachován. Data získaná studiem mikrosatelitů slouží k zjišťování příbuzenských vztahů mezi jedinci různých ptačích druhů. Zjišťují se takto mimopárová mláďata a vnitrodruhový hnízdni parazitizmus.

#### **3.8.2 Využití mikrosatelitů v ornitologii**

*Cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů je technika nejvíce studovaná u ptáků (Primmer *et al.*, 2005). Poprvé byla vyzkoušena na 48 různých druzích ptáků pomocí primerů odvozených od vlaštovky obecné a lejska černohlavého (Primmer *et al.*, 1996).

Přestože jsou mikrosatelity nejpoužívanějšími markery ve studiu populační biologie a genetiky, jeden z limitujících faktorů jejich aplikace je nedostatek „univerzálních“ PCR primerů, které by mohly úspěšně amplifikovat mikrosatelity u většiny druhů. Určitý stupeň amplifikace mikrosatelitů stejnými primery je možný mezi blízkými příbuznými druhy (Primmer *et al.*, 2005). Technika *cross-species* PCR využívá primerů donorových druhů, ze kterých byly mikrosatelity izolovány. Tyto primery jsou zkoušeny a studovány u příbuzných cílových druhů. Čím jsou druhy mezi sebou méně příbuzné, tím se možnost nalezení stejného mikrosatelitového lokusu u cílového druhu snižuje (Primmer *et al.*, 1996). Nevýhodou je také to, že se mikrosatelity v genomu ptáků vyskytují daleko méně, než v genomu savců (Primmer *et al.*, 1997).

*Cross-species* amplifikace je tak úspěšná, že různé evolučně genetické studie byly prováděny jedinečně za pomoci této techniky (Primmer *et al.*, 2005).

### 3.8.3 Studium polymorfních mikrosatelitů u pelikánů

Mikrosatelitové lokusy byly navrženy pro dva druhy pelikánů: pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*). Izolovány byly *de novo* z genomické DNA jedince daného druhu.

Bylo studováno celkem 46 jedinců pelikána bílého: 23 z Namibie a 23 z populace žijící v jižní Africe. Pro tohoto pelikána bylo popsáno 10 mikrosatelitových lokusů: PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265 a PEL304. Počet alel se pohyboval v rozmezí od 2 do 19. Pozorovaná heterozygotnost měla hodnotu od 0,261 do 0,913. 8 z těchto lokusů bylo polymorfních u příbuzných druhů pelikánů: pelikána hnědého (*Pelecanus occidentalis*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*) a pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) (de Ponte Machado *et al.*, 2009). Pelikán bílý je v Africe široce rozšířeným druhem. Na jihu tohoto kontinentu hnízdí ve třech různých oblastech a tvrdí se, že nedochází ke křížení mezi západními a východními populacemi, některé studie tuto teorii ovšem vyvracejí. Nalezené mikrosatelitové lokusy mohou být proto využity ke studiu fylogeografie, což je disciplína, která pomocí molekulárních markerů studuje příbuznost mezi jedinci na určitém území, mohou sloužit také pro určení stupně genového toku mezi koloniemi, stejně tak mohou zkoumat dopad efektu hrdla lahve (de Ponte Machado *et al.*, 2009).



Pro pelikána severoamerického bylo izolováno a charakteritováno 9 polymorfních mikrosatelitových lokusů: PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 07, PeEr 08 a PeEr 09. Tyto lokusy byly testovány na 23 jedincích z východní a západní populace Severní Ameriky. Počet alel se pohyboval od 2 do 8, pozorovaná heterozygotnost od 0,217 do 0,957. Pelikán severoamerický je největším ptákem Severní Ameriky žijícím v koloniích. Hnízdí převážně na ostrovech a na západě Skalistých hor. Tento pelikán byl dříve ohrožen vyhynutím, nicméně ochranné úsilí bylo úspěšné a počty pelikánů se na mnoha místech obnovily. V roce 2004 vytvářel největší kolonii vodních ptáků na pobřeží jezera v Severní Dakotě. Nalezené genetické markery mohou být využity jak ke studiu historie, ekologie a populační struktury pelikána severoamerického, tak k jeho ochraně, aby zůstal i nadále symbolem severoamerického západu (Hickman *et al.*, 2008).

Polymorfní mikrosatelitové lokusy u pelikánů jsou popsány v několika bakalářských a diplomových pracích studentů oboru Molekulární a buněčná biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Poprvé se studiem polymorfních lokusů zabývala bakalářská práce Ranochová (2006), která teoreticky navrhla použití polymorfních mikrosatelitů odvozených z DNA od několika druhů volavek a kormoránů. Diplomová práce Ranochová (2008) pokračuje v praktickém hledání mikrosatelitů pro pelikána afrického (*P. rufescens*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána kadeřavého (*P. crispus*) pomocí metody *cross-species* PCR s využitím primerů odvozených z DNA zástupců řádu veslonožů, brodivů a potápky. U pelikána afrického bylo nalezeno po 1 polymorfním mikrosatelitu odvozeném z DNA kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), volavky velké (*Ardea herodias*), ibise rudého (*Eudocimus ruber*) a nesyta lesního (*Mycteria americana*). U pelikána bílého bylo nalezeno po 1 polymorfním lokusu odvozeném z DNA kormorána velkého, ibise rudého a nesyta lesního a 4 polymorfní lokusy odvozené od volavky velké. Pro pelikána kadeřavého bylo nalezeno po 1 polymorfním lokusu odvozeném z DNA volavky velké a nesyta lesního.

Bakalářská práce Mikulová (2008) našla 5 polymorfních mikrosatelitů pro pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*): po 1 odvozeném z DNA kormorána velkého, ibise rudého a kormorána galapážského (*Phalacrocorax harissi*) a 2 odvozené z DNA volavky velké. Na tuto bakalářskou práci navazuje diplomová práce Mikulová (2010), kde byly nalezeny polymorfní lokusy pro pelikána afrického, bílého, kadeřavého a skvrnozobého. U pelikána afrického a kadeřavého bylo nalezeno 9, u

pelikána bílého 39 polymorfních mikrosatelitových lokusů a u pelikána skvrnozobého bylo nalezeno celkem 31 polymorfních mikrosatelitových lokusů, vč. bakalářské práce (Mikulová, 2008). U pelikána afrického byl nalezen 1 polymorfní lokus odvozený z DNA kormorána galapážského, 2 od ibise japonského (*Nipponia nippon*), po 3 od pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*) a pelikána bílého. U pelikána kadeřavého bylo nalezeno po 1 polymorfním produktu odvozeném z DNA ibise japonského a plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), 3 od pelikána bílého a 4 od pelikána severoamerického. Pro pelikána bílého bylo nalezeno po 1 polymorfním mikrosatelitu odvozeném z DNA tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*), tereje modronohého (*Sula nebouxii*) a alkounka drobného (*Aethia pygmaea*), po 2 odvozených od kormorána galapážského a volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*), po 3 od plameňáka karibského, čápa bílého (*Ciconia ciconia*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a kolpíka malého (*Platalea minor*), po 4 od ibise japonského, fregatky obecné (*Fregata minor*) a kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*) a nakonec 8 odvozených od pelikána severoamerického. Pro pelikána skvrnozobého bylo nalezeno po 1 polymorfním mikrosatelitu odvozeném z DNA ibise rudého, kormorána galapážského, tučňáka kroužkového a alkounka drobného, po 2 odvozených od volavky velké, plameňáka karibského, kvakoše nočního, kolpíka malého, volavky žlutozobé a kormorána ušatého, 3 odvozené od fregatky malé, 5 od pelikána bílého a nakonec 7 od pelikána severoamerického.

Bakalářská práce Chmelařová (2010) se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u pelikána kadeřavého. Bylo jich nalezeno 11. Po 1 odvozeném z DNA volavky žlutozobé, alkounka drobného, kormorána ušatého, ibise japonského, pelikána bílého a tereje modronohého, 2 odvozené od fregatky malé a 3 od plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*).

Bakalářská práce Dvořáková (2010) našla celkem 27 polymorfních mikrosatelitových lokusů pro pelikána afrického. Po 1 odvozeném z DNA volavky žlutozobé, alkounka drobného, čápa bílého, fregatky obecné, ibise japonského a kolpíka malého, po 5 odvozených od kormorána ušatého a plameňáka růžového, po 2 od kvakoše nočního, pelikána bílého, tereje modronohého a tereje červenonohého (*Sula sula*) a nakonec 3 polymorfní mikrosatelity odvozené od tereje guánového (*Sula variegata*).

### 3.8.3.1 PCR reakce

PCR reakce (*polymerase chain reaction*) je citlivá a v molekulární biologii často používaná technika, která umožňuje rychlé a snadné namnožení daného úseku DNA *in vitro* bez jakéhokoliv klonování ve vektorech, což je její obrovskou výhodou. Principem PCR je cyklicky se opakující syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA při katalýze enzymem DNA polymerázou.

Aby PCR reakce proběhla, musí reakční směs obsahovat kromě DNA polymerázy jeden pár primerů, 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTPs), hořčnaté ionty  $Mg^{2+}$ , pufr a deionizovanou vodu. DNA polymeráza musí být termostabilní, aby při vysokých teplotách nezdenaturovala. Pro PCR se proto používá např. termostabilní *Taq* DNA polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Hořčnaté ionty  $Mg^{2+}$  působí jako kofaktor, tvoří rozpustný komplex s dNTPs, který rozpoznává DNA polymeráza, interagují také s primery a s templátovou DNA. Všechny zmíněné složky musí být přítomny v přesně stanoveném množství a koncentraci, aby se předešlo vzniku nespecifických produktů. PCR reakční směs se přidá k vyizolované dvouvláknové DNA, která je rozpuštěná v deionizované vodě. Reakce probíhá v přístroji zvaném termocyklér, ve kterém dochází k automatickému střídání teplot.

PCR reakce má v zásadě tři hlavní kroky, ve kterých probíhají odlišné děje s jinými nároky na teplotu. Prvním krokem reakce je predenaturace dvouvláknové DNA působením vysoké teploty 94-97 °C po dobu 2-5 min. Poté se směs ochladí na teplotu 46-69 °C (teplotu *annealingu*) po dobu 30-60 s, při které dochází k hybridizaci primerů na specifická místa templátové DNA. Tato místa ohraničují úsek, který chceme namnožit a studovat. Primery se vážou na protilehlá vlákna denaturované DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. Třetím krokem je zvýšení teploty na 72 °C, kdy se aktivuje DNA polymeráza, která s využitím energie z dNTPs začne protisměrně syntetizovat nová vlákna ve směru 5'-3' na matricových řetězcích. Poté je teplota opět zvýšena na 94-97 °C. Dojde k denaturaci, která následující cykly probíhá pouze po dobu 15-45 s, protože *Taq* DNA polymeráza má poločas stability při 95 °C, 40 min. Tyto tři kroky se cyklicky opakují 25-35x. Tímto postupným opakováním dojde k exponenciálnímu namnožení, kdy je vytvořena až miliarda kopií hledaného úseku DNA.

### 3.8.3.2 Elektroforetická separace PCR produktu

Elektroforéza je obecně charakterizována jako separační, elektromigrační analytická metoda, která slouží k dělení molekul s elektrickým nábojem podle jejich molekulových hmotností.

Produkty PCR jsou molekulami DNA nesoucími záporný náboj, proto putují ve stejnosměrném elektrickém poli od katody k anodě. Dělení molekul probíhá v gelu, v trojrozměrném makromolekulárním síti. Molekuly s nižším počtem párů bazí se pohybují v gelu rychleji než molekuly s vyšším počtem párů bazí. Pro elektroforetickou separaci PCR produktu mohou být použity agarózové nebo polyakrylamidové gely. Vizualizace produktu je různá. Může být použit dusičnan stříbrný, ethidium bromid, SYBR green nebo jiná fluorescenční barviva.

### 3.8.4 Problémy při hodnocení výsledků

Použití mikrosatelitů pro determinaci paternity má také své nevýhody. Problémem může být výskyt nulových alel, *stutter* bandů nebo homoplazie alel, které stěžují hodnocení výsledků elektroforetické separace PCR produktů.

#### 3.8.4.1 Nulové alely

První nevýhodou použití mikrosatelitů v genetických analýzách je přítomnost nulových alel. Nulová alela je definována jako jakákoliv alela mikrosatelitového lokusu, která není technikou PCR amplifikována, což způsobí, že se daná alela nezobrazí na gelu (Dakin *et* Avise, 2004). Za možnou příčinu je považována mutace v místech přiléhajících k mikrosatelitovému lokusu, nebo-li *flanking regions*, na která se vážou primery. Jde obvykle o úsek blízky 3'konci primeru (Chapuis *et* Estoup, 2007). Kvůli mutaci primery nehybridizují a daný mikrosatelitový lokus není amplifikován. Další možnou příčinou vzniku nulových alel je odlišná amplifikace alel, které jsou různě velké. Kratší alely mohou být amplifikovány intenzivněji, než alely delší (Dakin *et* Avise, 2004).

Nulové alely mohou způsobit nesprávné vyloučení potenciálního otce. Je-li otec heterozygot pro nulovou alelu, na gelu se jeví jako homozygot, jelikož nulová alela není amplifikována. Mládě pak může být vyhodnoceno jako nepřibuzné. Aby se předešlo nesprávnému vyloučení rodiče, testuje se více mikrosatelitových lokusů (Dakin *et* Avise, 2004).

Dnes jsou využívány počítačové simulace pro studování evoluční dynamiky nulových alel, které odhadují jejich frekvenci a genetickou vzdálenost (Chapuis *et Estoup*, 2006). Nulová alela se dá dokázat tak, že se nasekvenuje PCR produkt hledaného lokusu u některých amplifikujících alel a upraví se sekvence nenasedajícího primeru, který se posune o několik nukleotidů vedle mutace. S takto upraveným párem primerů PCR reakce proběhne normálně, všechny alely se správně amplifikují a tento mikrosatelit se dá použít pro determinaci paternity.

#### **3.8.4.2 Stutter bandy**

*Stutter* bandy doprovázejí hlavní produkty PCR amplifikace jako několik pod sebou uspořádaných proužků, které připomínají standard molekulové hmotnosti. Nejvýraznější band je přesnou kopií originální alely, další bandy jsou slabší a počet jejich repetice je menší, než u hlavní alely (Luty *et al.*, 1990).

Důvodem vzniku *stutter* bandů je sklouznutí DNA polymerázy při syntéze komplementárního řetězce v oblasti repetice v průběhu PCR reakce. Pravděpodobnost posunutí DNA se zvyšuje se snižující se jednotkou repetice. Z toho vyplývá, že se *stutter* bandy vyskytují hlavně u sekvencí s nižším počtem repetice. Nejvíce se jich nachází u dinukleotidových repetice, méně u trinukleotidových a ještě méně u tetranukleotidových (Daniels *et al.*, 1998).

Výskyt *stutter* bandů může být problematický při hodnocení gelu, kdy se tyto bandy mohou splést s originální alelou nebo ji překrýt (Walsh *et al.*, 1996). Příliš velký počet *stutter* bandů u mikrosatelitového lokusu může být důvodem toho, že se tento mikrosatelit nedá použít pro determinaci paternity, přestože je polymorfní. Nelze u něj určit přesný počet alel. Řešením může být použití jiného druhu termostabilní DNA polymerázy, která by výskyt *stutter* bandů eliminovala.

#### **3.8.4.3 Alelová homoplazie**

Homoplazie je jev, kdy díky mutacím vznikají stejně velké alely s identickou sekvencí motivu u různých taxonů a populací, které nejsou odvozené od společného předka, ale vznikly konvergencí. Jejich původ se tedy liší (Scribner *et* Pearse, 2000; Estoup *et al.*, 2002).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

DNA byla izolována z krve 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) ze ZOO Dvůr Králové nad Labem, kde jsou tito vzácní ptáci úspěšně chováni. Krev byla odebrána pracovníky ZOO z tarzální žíly a umístěna v lyzačním Queen's pufu. DNA byla z krve získána pomocí fenol-chloroformové izolace s předpůsobením proteinázou K. Třídenní izolace byla provedena vedoucím práce RNDr. Petrem Nádvorníkem, Ph.D.

### 4.2 PCR amplifikace hledaných mikrosatelitových lokusů

#### Složení PCR reakční směsi pro 6 vzorků:

Deionizovaná voda	41,9 $\mu$ l
Storage Buffer A 10x	6,3 $\mu$ l
Roztok $MgCl_2$ (25 nmol/l)	3,75 $\mu$ l
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,65 $\mu$ l
Primer F (10 $\mu$ mol/l)	3,1 $\mu$ l
Primer R (10 $\mu$ mol/l)	3,1 $\mu$ l
<i>Taq</i> polymeráza (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Po napipetování všech složek do 1,5ml mikrozkušavky jsem tyto mikrozkušavky zvortexovala a zcentrifugovala. DNA o koncentraci 10-50  $\mu$ g/ml jsem napipetovala do PCR zkumavek (stripů). Ke každému z šesti vzorků DNA o objemu 1  $\mu$ l jsem přidala 9  $\mu$ l z PCR mixu. Stripy jsem zvortexovala, zcentrifugovala a umístila do termocykléru.

#### Časový a teplotní profil termocykléru:

35 cyklů	}	94 °C	5 minut
		94 °C	30 s
		50 °C	30 s
		72 °C	30 s
		72 °C	7 minut
		10 °C	neomezeně

Při prvních testech jsem teplotu *annealingu* nastavila na 50 °C. Mikrosatelity, které po elektroforetické separaci vypadaly monomorfně, jsem dále netestovala. U mikrosatelitů, které se zdály být polymorfní, jsem teplotu postupně zvyšovala, u některých až na 69 °C, aby produkt byl co nejspecifičtější a dal se z něj odečíst přesný počet alel a genotypy všech 6 testovaných jedinců. Pokud při *annealing* teplotě 50 °C nebyl elektroforetickou separací získán žádný produkt, teplotu jsem snížila na 48 °C popřípadě na 46 °C. Pokud ani v tomto případě nebyla amplifikace úspěšná, mikrosatelit jsem označila jako bez produktu.

#### 4.2.1 Hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů pomocí *cross-species* amplifikace u pelikána bílého a skvrnozobého

Polymorfní mikrosatelitové lokusy jsem hledala pomocí techniky *cross-species* amplifikace, kdy jsem do PCR směsi přidávala primery odvozené z DNA příbuzných druhů ptáků. Tyto PCR mixy jsem následně přidala k DNA pelikána bílého i pelikána skvrnozobého. Testovala jsem, jestli tyto *cross-species* primery, jejichž sekvence ohraničovala polymorfní mikrosatelitový lokus u příbuzných druhů ptáků, budou amplifikovat mikrosatelitové lokusy u pelikána bílého i skvrnozobého. Primery pocházely z DNA příbuzných druhů z řádu brodiví, veslonozí, plameňáci a z méně příbuzných druhů z řádu vrubozobí (viz Tabulka 1).

**Tabulka 1:** Přehled testovaných mikrosatelitových lokusů u pelikána bílého a skvrnozobého. Sloupce tabulky uvádějí: řád; zdrojový druh, ze kterého byl mikrosatelitový lokus izolován; název mikrosatelitového lokusu; autora a rok publikace.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Autor, rok publikace
Brodiví (Ciconiiformes)	Čáp bílý ( <i>Ciconia ciconia</i> )	CC1, CC3, CC7, CC9, CC 10, CC13	Segelbacher, osobní sdělení
	Volavka červenavá ( <i>Egretta rufescens</i> )	Er21, Er22, Er23, Er24, Er31, Er41, Ee42, Er43, Er44, Er45, Er46, Er51	Hill <i>et al.</i> , 2010
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopiterus ruber</i> )	Pruμ7, Pruμ8, Pruμ9	Kapil <i>et al.</i> , 2010

**Tabulka 1:** Pokračování.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Autor, rok publikace
<b>Plameňáci (Phoenicopteriformes)</b>	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopiterus ruber</i> )	Pr $\mu$ 13	Preston, 2005
	Plameňák růžový ( <i>Phoenicopiterus roseus</i> )	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139	Geraci <i>et al.</i> , 2010
<b>Veslonoží (Pelecaniformes)</b>	Faeton žlutozobý ( <i>Phaethon lepturus</i> )	P3A3, P3A4, P3C1, P3D7, P3F3, P3F5, P3F7, P3G12, P3H10, P4F2, P4G1	Humeau <i>et al.</i> , 2010
	Kormorán chocholátý ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> )	Phaari01, Phaari02, Phaari03, Phaari05, Phaari06, Phaari08, Phaari11, Phaari12, Phaari14, Phaari16	Barlow <i>et al.</i> , 2010
		Phaari04, Phaari07, Phaari09, Phaari13, Phaari15, Phaari17	Barlow, osobní sdělení
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	Dcco-01, Dcco-02, Dcco-03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08	Mercer <i>et al.</i> , 2010



**Tabulka 1:** Pokračování.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Autor, rok publikace
<b>Veslonoží (Pelecaniformes)</b>	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	Morris-Pocock <i>et al.</i> , 2010
	Terej guánový ( <i>Sula variegata</i> )	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-95, Sv2B-152, Sv2B-27, Sv2B-138	Taylor <i>et al.</i> , 2010
	Terej modronohý ( <i>Sula nebouxii</i> )	Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B-100	Taylor <i>et al.</i> , 2010
<b>Vrubozobí (Anseriformes)</b>	Kachna divoká ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	APH07, APH09	Maak <i>et al.</i> , 2000
		APH08, APH12, APH13, APH16	Maak <i>et al.</i> , 2003
	Kachnice laločnatá ( <i>Biziura lobata</i> )	Blm1, Blm10, Blm12	Guay <i>et Mulder</i> , 2005
	Kajka mořská ( <i>Somateria mollissima</i> )	Smo10	Paulus <i>et Tiedmann</i> , 2003
	Pížmovka velká ( <i>Cairina moschata</i> )	CmAAT16, CmAAT35, CmAAT38	Stai <i>et Hughes</i> , 2003

## 4.2.2 Zpracování PCR produktů

Tento postup je optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 333 x 392 mm a 333 x 418 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

1. Velké sklo jsem z obou stran omyla destilovanou vodou a vydrhla kartáčem, osušila a ošetřila 96% ethanolem na ploše, která se bude dotýkat gelu. V digestoři jsem na tuto plochu nanasla přípravek pro odpuzování vody ze skel a nechala pět minut působit. Poté jsem sklo opláchla destilovanou vodou ze stříčky a nakonec osušila.
2. Menší sklo jsem pod tekoucí vodou s použitím saponátu vydrhla kartáčem z obou stran, osušila a plochu, která se bude dotýkat gelu, jsem ošetřila 96% ethanolem. V digestoři jsem na tuto plochu skla nanasla molekulární lepidlo, které jsem připravila v 1,5ml mikrozkuhavce smícháním 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu s 3  $\mu$ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Papírovým ubrouskem jsem lepidlo rozetřela a nechala ho 5 minut působit, aby zaschlo. Nakonec jsem plochu skla čtyřikrát opláchla 96% ethanolem a pokaždé osušila papírovým ručníkem.
3. Velké sklo jsem položila na polystyrenovou desku ošetřenou plochou vzhůru a na něj po stranách umístila 0,4 mm silné spacery. Malé sklo jsem ošetřenou plochou dolů položila na velké sklo a obě sepnula po obou stranách dvěma klipsy.
4. Gel jsem připravila v kádince smícháním 60 ml 6% roztoku akrylamid : N,N'-metylenbisakrylamid 19 : 1, 40  $\mu$ l N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu a 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného. Po promíchání v kádince jsem roztok začala postupně nalévat mezi skla a zároveň na ně poklepávala, dokud se celý prostor mezi skly nevyplnil.
5. V místě, kde se nalíval gel, jsem vložila rovnou stranou hřebínek asi 0,7 cm hluboko, aby se vytvořila rovná hrana gelu pro pozdější aplikaci hřebínku. V místě hřebínku jsem skla sepnula čtyřmi klipsy a gel nechala minimálně hodinu polymerizovat.
6. Po utužení gelu jsem klipsy odstranila a skla důkladně omyla kartáčem od zbytků polyakrylamidu. Osušila jsem je papírovým ručníkem a pevně upevnila

pomocí šroubů do elektroforetické komůrky tak, aby se kratší sklo dotýkalo hliníkové desky a hrana s hřebínkem směřovala nahoru. Nakonec jsem utáhla uzávěr na straně, aby neodtékal pufr.

7. Katodový i anodový prostor jsem zalila 0,5 x TBE puftrem, vytáhla hřebínek a mezeru mezi skly vyčistila proudem pufru z injekční stříkačky. Uzavřela jsem katodový i anodový prostor, připojila elektrody a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastavila hodnotu výkonu 90 W, přičemž hodnoty elektrického napětí i proudu jsem nastavila na maximální hodnotu: 3000 V/150 mA. Gel jsem za těchto podmínek nechala nahřívat asi 30 minut na teplotu 50 °C. Během nahřívání gelu jsem zkumavky se vzorky zcentrifugovala a v digestoři smíchala s 5 µl nanášecího pufru.
8. Po vypnutí zdroje a odpojení elektrod jsem prostor mezi skly opět vyčistila proudem vody ze stříkačky. Vzorky jsem dala zdenaturovat na 3-5 minut do termocykléru. Mezitím jsem mezi skla vložila hřebínek maximálně 1 mm hluboko do gelu. Na konci denaturace jsem vzorky okamžitě vložila do ledové tříště, aby se zabránilo jejich renaturaci.
9. Do mezer mezi zoubky hřebínku jsem osmikanálovou pipetou nanasla 2 µl vzorků. Po napipetování všech vzorků jsem uzavřela katodový prostor, zapojila elektrody a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastavila hodnotu výkonu 70 W, hodnoty napětí i proudu zůstaly nastaveny stejně jak u předešlého nahřívání gelu.
10. Během elektroforetického dělení vzorků jsem připravila tyto roztoky: 800 ml roztoku 10% kyseliny octové (fix/stop roztok), 800 ml roztoku 1% HNO<sub>3</sub>, 800 ml roztoku 0,1% roztoku AgNO<sub>3</sub> a 800 ml 3% roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (vývojka), který jsem umístila do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než 10 °C.
11. Po uplynutí času elektroforetického dělení vzorků jsem vypnula zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojila obě elektrody a šroubem na pravé straně elektroforetické komůrky otevřela kanálek, aby pufr z katodové části přetekl do sběrného prostoru. Povolila jsem šrouby a skla s gelem vyjmula z elektroforetické komůrky a položila na misku vodorovně malým sklem vzhůru. Z prostoru mezi skly jsem vytáhla spacers a pomocí nože malé sklo oddělila od velkého a vložila na třepačku do fotomisky gelem vzhůru, kde jsem ho zalila fix/stop roztokem a nechala působit 20 minut.

12. Po uplynutí dvaceti minut jsem fix/stop roztok slila zpátky do Erlenmayerovy baňky a sklo třikrát promyla 1 až 1,5 litru destilované vody. Sklo jsem opět dala do fotomisky na třepačku a zalila 1% roztokem  $\text{HNO}_3$ . Po pěti minutách jsem roztok kyseliny vylila do dřezu a sklo čtyřikrát promyla 1 až 1,5 litry destilované vody.
13. Sklo s gelem jsem umístila do druhé fotomisky a zalila 0,1% roztokem  $\text{AgNO}_3$ , do něž jsem těsně před použitím přidala 1,2 ml formaldehydu pro odstranění nespecifického pozadí. Tento roztok jsem nechala působit na sklo s gelem 30 minut.
14. Po 30 minutách jsem stříbro slila zpátky do lahve a sklo s gelem ponořila na pět vteřin do misky s destilovanou vodou, aby se opláchl přebytečný dusičnan stříbrný. Poté jsem sklo umístila na třepačku do fotomisky určené pro vyvolávání a zalila vývojkou (800 ml vychlazeného 3% roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , do kterého se jsem těsně před vyvoláváním přidala 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu\text{l}$  1% roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ).
15. Díky vývojce se postupně začaly objevovat hnědočerné stříbrem obarvené proužky PCR produktů. Až byly dostatečně zřetelné, vyvíjení zbarvení jsem zastavila fix/stop roztokem, který působil na gel asi 2 minuty, dokud se v podobě bublinek nevytloučil  $\text{CO}_2$ .
16. Roztok jsem slila a sklo s gelem ponořila na 2 minuty do deionizované vody. Nakonec jsem sklo dala do sušárny, kde byl gel při 90 °C za 20 minut usušen. Nakonec bylo sklo vyhodnoceno na negatoskopu, kde byly určeny polymorfni mikrosatelity a počet jejich alel.
17. Sklo bylo neskenováno a poté s již nepotřebným gelem ponořeno na několik desítek minut až několik hodin do roztoku  $\text{NaOH}$  o koncentraci 1 mol/l, kde se gel kompletně odlepil. Sklo tak mohlo být použito znovu.

### 4.3 Použité chemikálie

- Akrylamid (Serva)
- aTaq DNA polymeráza (5U/ $\mu\text{l}$ ), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400  $\mu\text{l}$  každého), U1240 (Promega)

- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol – 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na<sub>2</sub>EDTA) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hoechst, No. 33258 (Sigma)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Chloroform (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová – ledová (Lachema)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)
- N,N'- methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N'- tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Proteináza K (Sigma)
- Clear Vue, Rain Repellent (Turtle WAX)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

## 4.4 Použité roztoky

### Zásobní roztok 6% akrylamidu:

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

### Zásobní roztok 10x TBE pufru:

- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 55 g kyseliny borité  $H_3BO_3$
- 40 ml roztoku  $Na_2EDTA$  0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustit v 800 ml deionizované vody
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

### Roztok 10% peroxidisíranu amonného $(NH_4)_2S_2O_8$ :

- 1 g  $(NH_4)_2S_2O_8$
- rozpustit v 10 ml deionizované vody
- uchovávat v chladničce

### Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:

- 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
- 3  $\mu$ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

### Polyakrylamidový 6% gel:

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 40  $\mu$ l N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu
- 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného  $(NH_4)_2S_2O_8$

### Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

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

- 100 ml formamidu

**Fix/stop roztok:**

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

**Roztok 1% kyseliny dusičné HNO<sub>3</sub>:**

- 800 ml deionizované vody
- 12 ml 65% HNO<sub>3</sub>

**Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného AgNO<sub>3</sub>:**

- 0,8 g AgNO<sub>3</sub>
- objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

**Vývojka:**

- 800 ml deionizované vody
- 24 g uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- umístit do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než 10 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Roztok hydroxidu sodného NaOH 1 mol/l:**

- 40 g hydroxidu sodného
- rozpustit v 800 ml deionizované vody
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

**Queen's pufr:**

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,8
- 2 ml zásobního roztoku NaCl (5 mol/l)
- 2,92 g ethylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA)
- 10 g N-lauroylsarkosinu
- rozpustit v 900 ml deionizované vody
- pH upravit na 7,5

- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

#### **TE pufr:**

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 200 µl zásobního roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustit v 900 ml deionizované vody
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l a zfiltrvat

#### **4.5 Laboratorní přístroje**

- Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)
- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy MARKS G22, Elektronik (Belengineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette 0,5 až 10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichpipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Cleaver Scientific Ltd)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna HS 122S (Chirana)
- Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Techne)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Scientific)
- Termocyklér XP Thermal Cyclor (BIOER technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)



## **5 Výsledky**











## **6 Diskuze**









## 7 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy pro pelikána bílého a skvrnozobého pomocí *cross-species* amplifikace testováním primerů odvozených z DNA příbuzných druhů ptáků z řádu veslonozí, plameňáci, brodiví a vrubozobí.

Pro pelikána bílého jsem našla 20 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Z řádu veslonozí byly 3 odvozené z DNA tereje modronohého (*Sula nebouxii*), 1 odvozený z DNA tereje guánového (*Sula variegata*), 4 odvozené z DNA tereje červenonohého (*Sula sula*), 3 odvozené z DNA kormorána chocholatého, 1 odvozený z DNA kormorána ušatého a 1 z DNA faetona žlutozobého. Dále jsem testovala řád plameňáci, kde jsem našla 4 mikrosatelity odvozené z DNA plameňáka růžového (*Phaethon rubricauda*). Z řádu brodiví byl odvozen 1 mikrosatelit z DNA čápa bílého (*Ciconia ciconia*) a 2 odvozené z DNA volavky červenavé (*Egretta rufescens*). 19 z nich navrhuji jako markery pro determinaci paternity. Pouze 1 mikrosatelit byl nehodnotitelný, přestože polymorfismus vykazoval. Navrhuji proto použití jiné DNA polymerázy, např. *Pfu* polymerázy, která by mohla poskytnout lepší výsledky.

Pro pelikána skvrnozobého jsem našla 9 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Z řádu veslonozí jsem našla 2 mikrosatelity odvozené z DNA tereje modronohého (*Sula nebouxii*), 1 odvozený z DNA tereje červenonohého (*Sula sula*), 1 odvozený z DNA kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*) a 1 z DNA faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*). Z řádu plameňáci jsem našla 2 mikrosatelity odvozené z DNA plameňáka růžového a 2 odvozené z DNA čápa bílého (*Ciconia ciconia*). 7 z těchto mikrosatelitů navrhuji jako markery pro determinaci paternity. Zbylé 2 jsou sice polymorfní, ale nehodnotitelné. Proto navrhuji použít jinou DNA polymerázu.

Amplifikace primerů odvozených z řádu vrubozobí nebyla úspěšná u žádného z pelikánů.

## 8 Seznam zkratek

A	adenin
bp	pár bází ( <i>base pair</i> )
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty
EPP	mimopárová paternita ( <i>extra-pair paternity</i> )
G	guanin
H <sub>o</sub>	pozorovaná heterozygotnost ( <i>observed heterozygosity</i> )
LINEs	dlouhé rozptýlené repetice ( <i>long interspersed elements</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
RFLP	délkový polymorfismus restričních fragmentů ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
SINEs	krátká rozptýlená repetice ( <i>short interspersed elements</i> )
SSR	repetice jednoduchých sekvencí ( <i>simple sequence repeats</i> )
STR	krátké tandemové repetice ( <i>short tandem repeats</i> )
T	tymin
T <sub>a</sub>	teplota <i>annealingu</i>
t <sub>e</sub>	čas separace PCR produktu v 6% polyakrylamidovém gelu
VNTR	variabilní počet tandemových repeticí ( <i>variable number of tandem repeats</i> )

## 9 Použitá literatura

- Amour JAL, Alegre SA, Miles S, Williams LJ, Badge RM (1999): Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: Goldstein DB, Schlötterer C (Eds.): *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York.
- Anonymous (2006): Pelikán bílý. Rozšíření. Publikováno on-line <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id8378/>, navštíveno dne 5.7.2011.
- Anonymous (2009): Pelikán skvrnozobý. Charakteristika. Publikováno on-line <http://www.zoozlin.eu/cz/zvirata-a-expozice/zvirata.html?zvire=pelikan-skvrnozoby>, navštíveno dne 5.7. 2011.
- Barlow EJ, Telford A, Daunt F, Cavers S (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*. In press.
- Brown TA (2007): Klonování genů a analýza DNA. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Buschiazzo E, Gemmel NJ (2006): The rise, fall and the renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28, 1040-1050.
- Černý W (1980): Barevný průvodce artie: Ptáci. Artia, Praha.
- Dakin EE, Avise JC (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis: *Heredity* 93, 504–509.
- Daniels J, Holmans P, Williams N, Turic D, McGuffin P, Plomin R, Owen MJ (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 Genetics* 62, 1189-1197.
- de Ponte Machado M, Feldheim KA, Sellas AB, Bowie RCK (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.
- del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (1992): *Handbook of the Birds of the World*. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.
- Dvořáková B (2010): Analýza polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Ellegren H (2004): Microsatellites simple sequences with complex evolution. *Nature reviews. Genetics* 5, 435-445.
- Estoup A, Jarne P, Cournet J-M (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.
- Gaisler J (1983): *Zoologie obratlovců*. Academia, Praha.
- Gaisler J, Zima J (2007): *Zoologie obratlovců*, 2. přepracované vydání. Academia, Praha.
- Gibson G, Muse SV (2009): *A Primer of Genome Science*. Third edition. Sinauer Associates, Inc., USA.
- Geraci J, Gaillard M, Bechet A, Cezilly F, Wattier RA (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*. In press.
- Glenn TC, Schable NA (2005): Isolating Microsatellite DNA Loci. *Methods in enzymology* 395, 202-222.

- Gosler A (1994): Atlas ptáků světa. Příroda a.s., Bratislava.
- Griffith SC, Owens IPF, Thuman KA (2002): Extra-pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* 11, 2195-2212.
- Guay P-J, Mulder RA (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.
- Hanzák J, Hudec K (1974): Světem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci. Albatros, Praha.
- Hickman CR, Peters MB, Crawford NG, Hagen C, Glenn C, Somers CM (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* 8, 1439-1441.
- Hill A, Green MC (2010): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources*. In press.
- Humeau L, Da Silva D, Guérin F, Jaquemet S, Requier J-B, Le Corre M (2010): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Phaethon lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources*. In press.
- Chambers K, MacAvoy E (2000): Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126, 455-476.
- Chapuis MP, Estoup A (2007): Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621-631.
- Chmelařová A (2010): Analýza polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Kapil R, Sawyer GM, Preston L, Benjamin RC (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*. Preprint.
- Li YCh, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11, 2453-2465.
- Luty JA, Guo Z, Willard HF, Ledbetter DH, Ledbetter S, Litt M (1990): Five polymorphic microsatellite VNTRs on the human X chromosome. *American Journal of Human Genetics* 46, 776-783.
- Maak S, Neumann K, von Lengerken G, Gattermann R (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics* 31, 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.
- Mercer DM, Haig SM, Mullis TD (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation genetics Resources*. In press.
- Mikulová V (2008): Studium paternity u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Mikulová V (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

- Morris-Pocock JA, Taylor SA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). Molecular Ecology Resources. In press.
- Nelson JB (2005): Pelicans, Cormorants, and their Relatives. The Pelecaniformes, 1st ed. Oxford University Press, Oxford.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Carneiro Vieira ML (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology 29, 294-307.
- Paulus KB, 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.
- Petrie M, Kempnaers B (1998): Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. Trends in Ecology & Evolution 13, 52-58.
- Preston EL (2005): Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Ph.D. dissertation, University of North Texas, USA.
- Primmer CR, Møller AP, Ellegren H (1996): A wide-range survey of *cross-species* microsatellite amplification in birds. Molecular Ecology 5, 365-378.
- Primmer CR, Raudsepp T, Chowdhary BP, Moller AP, Ellegren H (1997): Low frequency of microsatellites in the avian genome. Genome Research 7, 471-482.
- Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merila 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, 781-787.
- Ranochová A (2006): Studium paternity u pelikánů (*Pelecanus* spp.) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Ranochová A (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Scribner KT, Pearce JM (2000): Microsatellites: Evolutionary and Methodological Background and Empirical Applications at Individual, Population and Phylogenetic Levels. In: Baker, A.J. (Ed.): Molecular Methods in Ecology. Blackwell Science Ltd., Oxford
- Schreiber EA (1994): Pelikáni a jejich příbuzní. In: Homolová, Š. (Ed.): Obratlovci: savci, ptáci, obojživelníci, plazi: encyklopedický průvodce světem zvířat. Nakladatelský dům OP, Praha.
- Snustad DP, Simmons MJ (2009): Genetika. Masarykova Univerzita, Brno.
- Stai SM, Hughes CR (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). Animal Genetics 34, 387-389.
- Svensson L, Grant PJ (2004): Praktická určovací příručka: Ptáci Evropy, severní Afriky a blízkého východu. Nakladatelství Svojtka & Co., Praha.
- Taylor SA, Morris-Pocock JA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). Journal of Ornithology 151, 525-528.
- Tóth G, Gáspari Z, Jurka J (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. Genome Research 10, 967-981.
- Veselovský Z (2001): Obecná ornitologie. Academia, Praha.

- Walsh SP, Fildes NJ, Reynolds R (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acid Research* 24, 2807-2812.
- Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD (1994): Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 88, 1-6.
- Weising K, Nybom H, Wolff KK, Kahl G (2005): *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications, Second Edition*. CRC Press, Boca Raton
- 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.