

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2010**

**Anna Chmelařová**

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



**Analýza polymorfních *cross-species*  
mikrosatelitů pro determinaci paternity  
u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*)**

**Bakalářská práce**

**Anna Chmelařová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2010**

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

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

V Olomouci dne 6.5. 2010

.....

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho trpělivost i čas, který mi během psaní bakalářské práce věnoval, za jeho odbornou pomoc, věcné připomínky a motivaci pro mé další studium. Velký dík patří také kolegům v laboratoři za cenné rady.

Práce vznikla za finanční podpory Vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (IGA UPOL) v rámci projektu PrF\_2010\_052 „Mezidruhová amplifikace polymorfních DNA mikrosatelitů u vodních ptáků“.

## Souhrn

Pelikán kadeřavý (*Pelecanus crispus*) je zástupce řádu veslonozí (Pelecaniformes), který patří mezi zranitelné druhy. Vyskytuje se v oblasti Středozemního a Černého moře, v jižní a jihozápadní Asii a v severovýchodní Africe. U pelikána kadeřavého nebyly dosud popsány polymorfní mikrosatelitové lokusy. Primery amplifikující polymorfní mikrosatelitové lokusy byly navrženy pouze pro příbuzné druhy z řádu veslonozí (Pelecaniformes).

Tato bakalářská práce se zabývá nalezením polymorfních mikrosatelitových lokusů vhodných pro určování paternity u pelikána kadeřavého pomocí jejich *cross-species* PCR amplifikace s použitím primerů odvozených od příbuzných i nepříbuzných druhů ptáků z řádů veslonozí (Pelecaniformes), brodiví (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), dlouhokřídlí (Charadriiformes), potáplice (Gaviiformes), tučňáci (Sphenisciformes) a vrubozobí (Anseriformes).

Z celkového počtu 223 testovaných mikrosatelitů bylo nalezeno 11 polymorfních lokusů, které měly od 2 do 6 alel. Průměrný počet alel byl 2,64, průměrná pozorovaná heterozygotnost byla 0,36. Při použití tohoto souboru polymorfních mikrosatelitových lokusů byla pravděpodobnost 0,003 %, že by dva jedinci měli stejnou alelovou konstituci. Soubor nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů může být použit při následných studiích paternity a struktury populací u pelikána kadeřavého.

## Summary

Dalmatian pelican (*Pelecanus crispus*) is the representative of the order of Pelecaniformes, which belongs to the vulnerable species. It occurs in the Mediterranean and Black Sea, South and Southwest Asia and North Africa. Polymorphic microsatellite loci have not been described yet for Dalmatian pelican. There were designed only primers amplified polymorphic microsatellite loci for related species of the order of Pelecaniformes.

This bachelor work deals with finding of polymorphic microsatellite loci suitable for paternity determination of the Dalmatian pelican, by means of their *cross-species* PCR amplification, using the primers derived from related and unrelated bird species of the order of Pelecaniformes, Ciconiiformes, Phoenicopteriformes, Charadriiformes, Gaviiformes, Sphenisciformes and Anseriformes

From the total number of 223 tested microsatellites, 11 polymorphic loci were discovered. The average number of alleles was 2.64 and the average observed heterozygosity was 0.36. Using this polymorphic microsatellite loci was 0.003 % probability that two individuals have the same allele constitution. Those microsatellite loci can be used for the subsequent paternity and population structure studies of Dalmatian pelican.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>10</b>
3.1	Řád veslonozí (Pelecaniformes) .....	10
3.1.1	Čeď pelikánovití (Pelecanidae).....	11
3.1.2	Pelikán kadeřavý ( <i>Pelecanus crispus</i> ) .....	12
3.2	Mimopárové chování a paternita u ptáků .....	15
3.3	Repetitivní sekvence DNA .....	16
3.3.1	Satelity .....	16
3.3.2	Minisatelity .....	17
3.3.3	Mikrosatelity .....	17
3.4	Dělení mikrosatelitů.....	18
3.5	Původ, evoluce a mutace mikrosatelitů .....	18
3.6	Principy hledání nových mikrosatelitových lokusů.....	19
3.7	Využití mikrosatelitů .....	20
3.7.1	Využití mikrosatelitů při paternitních studiích .....	20
3.8	Využití <i>cross-species</i> PCR amplifikace mikrosatelitů v ornitologii.....	21
3.8.1	Polymerázová řetězová reakce.....	22
3.8.2	Elektroforetická separace PCR produktu.....	22
3.8.3	Problémy při hodnocení PCR produktů.....	23
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>25</b>
4.1	Biologický materiál.....	25
4.2	Izolace genomické DNA pro PCR z ptáčích krve .....	25
4.3	Hledání vhodných mikrosatelitových markerů pro pelikána kadeřavého metodou <i>cross-species</i> PCR .....	26
4.3.1	PCR amplifikace mikrosatelitové DNA .....	30
4.3.2	Zpracování PCR produktů .....	30
4.4	Použité chemikálie .....	33
4.5	Použité roztoky .....	34
4.6	Laboratorní přístroje .....	36
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>53</b>

# 1 Úvod

Mikrosatelity jsou tandemové repetitivní oblasti DNA s délkou motivu 1 až 6 párů bází, které byly nalezeny v genomech všech dosud zkoumaných eukaryotických organismů. Díky mutacím, jimž často podléhají, je pro ně charakteristický vysoký stupeň délkového polymorfismu, proto se v poslední době staly vhodnými markery při genetických studiích, například pro určení paternity, genetické struktury populací nebo fylogenetické příbuznosti organismů. Při hledání nových mikrosatelitových lokusů je možné postupovat dvěma odlišnými způsoby: izolovat mikrosatelitové lokusy *de novo* z genomických knihoven zkoumaného druhu nebo amplifikovat tyto lokusy *cross-species* PCR s využitím primerů navržených primárně pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů u příbuzných druhů.

U pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) nebyly dosud popsány žádné mikrosatelitové lokusy. Ve své bakalářské práci se proto věnuji hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů vhodných pro determinaci paternity u tohoto druhu pomocí *cross-species* PCR amplifikace s primery navrženými pro příbuzné i nepříbuzné zástupce řádů veslonozí (Pelecaniformes), brodiví (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), dlouhokřídlí (Charadriiformes), potáplice (Gaviiformes), tučňáci (Sphenisciformes) a vrubozobí (Anseriformes).



## 2 Cíle práce

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

## 3 Literární přehled

### 3.1 Řád veslonozí (Pelecaniformes)

Řád veslonozí (Pelecaniformes) zahrnuje šest čeledí - fregatky (Fregatidae), pelikány (Pelecanidae), anhingy (Anhingidae), tereje (Sulidae), kormorány (Phalacrocoracidae) a faetony (Phaetontidae) (Nelson, 2005). Braun *et al.* (1993) dále rozdělují veslonohé do dvou podřádů – Phaetoni a Pelecani. Podřád Phaetoni obsahuje pouze čelď Phaetonidae, do podřádu Pelecani jsou zařazeny všechny zbylé čeledi.

Veslonozí byli systematickými biology dříve považováni za monofyletickou skupinou (Nelson, 2005). V současné době se přiklánějí spíše k názoru, že jde o taxon parafyletický nebo polyfyletický, což potvrzují moderní analýzy jako jsou rozbory DNA nebo proteinů vaječného bílku. Výsledky molekulárních studií založených na hybridizaci DNA a studiu mitochondriální DNA ukazují, že některé druhy jsou příbuznější zástupcům ze zcela jiných řádů (Hedges *et Sibley*, 1994). Faetoni jsou podle těchto studií spojováni s rybákovitými (Sternidae) z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes). Pelikáni jsou si velmi blízcí s člunozobcem africkým (*Balaeniceps rex*), který je zařazován do řádu brodiví (Ciconiiformes). Fregatky jsou příbuzné s buňňákovitými (Procellariidae) a albatrosovitými (Diomedeidae) z řádu trubkonosí (Procellariiformes), potáplicemi (Gaviiformes) a tučňáky (Sphenisciformes). Terejové, kormoráni a anhingy tvoří fylogeneticky úzce propojenou skupinu, kterou někteří autoři považují za monofyletickou.

Veslonozí jsou velcí vodní ptáci s veslovací nohou, která má všechny čtyři prsty spojené plovací blánou (Gaisler *et Zima*, 2007). Všichni mají mohutný hluboce rozeklaný zobák a hrdelní vak různé velikosti. Mají kostrční žlázu, silný jazyk, roztažitelný jícen, třídlílný žaludek, redukované vnější nozdry a chybí jim vomer.

Přestože se jedná o primárně mořské ptáky, vyskytují se také ve většině vodních biotopů na pevnině (Schreiber, 1994). Pelikáni a kormoráni hnízdí ve vnitrozemí a mimo dobu hnízdění se stěhují do oblastí u moře. Většina druhů se vyskytuje v tropech a subtropích, některé ale lze najít také v mírném nebo i arktickém klimatickém pásu (Brown *et al.*, 1993).

Živí se hlavně rybami, ale i drobnými bezobratlými živočichy, některé druhy také vejci (Hanzák *et Hudec*, 1974). Tvar jejich těla je uzpůsoben stylu lovu. Kormoráni a anhingy se pro kořist potápějí, fregatky ji naopak sbírají z mořské hladiny v letu.

Většina zástupců tohoto řádu hnízdí v koloniích (Schreiber, 1994). Mnoho z nich se vrací každý rok přesně na stejné místo a páří se s tímž partnerem. Na vejcích sedí oba rodiče a stejně tak se oba starají o vylíhnutá mláďata. Mláďata se líhnou holá, výjimkou jsou faetoni, jejichž jediné mládě je po vyklubání pokryto jemným našedlým chmýřím.

Jejich systém vzdušných vaků je téměř dokonalý (Schreiber, 1994). Jeho odbočky u některých druhů vyplňují kromě hrudního koše také spodní část krku a vytvářejí tak měkké polštáře, o nichž se předpokládá, že tlumí náraz na vodní hladinu při střemhlavém lovu.

### 3.1.1 Čeleď pelikánovití (Pelecanidae)

Do čeledi pelikánovití patří dva vyhynulé rody a jeden recentní. Del Hoyo *et al.* (1992) uvádějí následující recentní druhy: pelikán africký (*Pelecanus rufescens*), pelikán bílý (*P. onocrotalus*), pelikán kadeřavý (*P. crispus*), pelikán hnědý (*P. occidentalis*), pelikán australský (*P. conspicillatus*), pelikán severoamerický (*P. erythrorhynchos*) a pelikán skvrnozobý (*P. philippensis*). Dříve existovalo více druhů pelikánů, nejméně deset z nich je známo pouze z fosilních pozůstatků (Alderton, 1995).

Pelikánovití jsou velcí vodní ptáci s hedvábným peřím (Brown *et al.*, 1993). Obvykle jsou bílí, šedí, někteří také hnědí nebo černí. Sladkovodní druhy jsou světlé, mořské bývají zbarveny hnědě (Hanzák *et* Hudec, 1974). Mají zajímavě konstruovaný zobák. Dolní čelist tvoří dvě tenké a ohebné na špičce spojené větve, mezi nimiž je široký pružný vak. Pokud letí nebo plavou, přitahují zobák ke krku. Nohy jsou v poměru k tělu poměrně malé opatřené plovací blánou, která spojuje čtyři prsty.

Samice klade v jedné snůšce 2 až 4 modrobílá vejce (Bouchner, 1972), jejichž inkubace trvá 4-7 týdnů v závislosti na konkrétním druhu. Mláďata mohou na rozdíl od dospělců vydávat zvuky, čehož využívají při hlasitém žadonění o potravu (Schreiber, 1994; Nelson, 2005). Rodiče je krmí částečně natrávenou potravou, kterou přinášejí v hrdelním vaku. Mláďata do vaku vsouvají zobáky, někdy i hlavičky, aby zde získala potravu (Hanzák *et* Hudec, 1974). Zajímavé je, že pelikáni dosahují největší hmotnosti v prvních letech svého života, mláďata mohou vážit i 14 kg, protože mají velké zásoby tuku (Alderton, 1995).

Pohlavní dospělosti dosahují až po několika letech života (Hanzák *et* Hudec, 1974). Dospělí jedinci loví až 30 cm dlouhé ryby, které polykají vcelku. Podle Schreiber (1994) pelikán hnědý nepohrdne ani mršinou.

Pelikánovití jsou ohroženi lidskou činností. Jedná se hlavně o rušivé zásahy v hnízdních koloniích, lokální znečištění vody, přítomnost pesticidů a ničení prostředí, ve kterém ptáci hnízdí (Schreiber, 1994).

Systematické zařazení rodu pelikán (Brown *et al.*, 1993):

kmen:	Strunatci (Chordata)
podkmen:	Obratlovci (Vertebrata)
třída:	Ptáci (Aves)
nadřád:	Letci (Neognathae)
řád:	Veslonozí (Pelecaniformes)
podřád:	Pelecani
čeleď:	Pelikánovití (Pelecanidae)
rod:	Pelikán ( <i>Pelecanus</i> )

### 3.1.2 Pelikán kadeřavý (*Pelecanus crispus*)

Pelikán kadeřavý, latinsky *Pelecanus crispus*, anglicky Dalmatian pelican, byl v minulosti nazýván také pelikán dalmatský podle Dalmácie, kde byl Bruchem roku 1832 popsán a pojmenován (Brown *et al.*, 1993).

Pelikán kadeřavý je největším a nejvýznamnějším zástupcem z čeledi Pelecanidae. Podobá se pelikánu bílému, ale je o něco větší. Délka těla od zobáku po ocas je obdobná jako u labutě velké (*Cygnus olor*), tedy 160 až 180 cm (Dungel *et* Hudec, 2001). Rozpětí křídel se pohybuje mezi 270 a 320 cm, hmotnost může být až 15 kg (Schreiber, 1994). Samec a samice se neliší vzhledem, narozdíl od pelikána bílého mají opeřené čelo až ke kořeni zobáku (Nelson, 2005). V době hnízdění v tzv. svatebním šatu jsou shora stříbřitě bílí, s lehkým šedomodrým zbarvením na břišní straně a žlutými skvrnami na krku (del Hoyo *et al.*, 1992; Nelson, 2005). Loketní letky jsou popelavé, ruční letky černé. Na temeni hlavy a krku se vytvářejí nápadné rozčuchané chocholky viz Obr. 1., které se zasloužily o jeho český název. Zobák je nažloutlý s oranžovou špičkou, hrdelní vak oranžovočervený a nohy převážně šedivé. Mimo období páření je zobák tmavě šedivý, vak světle žlutý, chocholka se ztrácí nebo je méně nápadná a celkově je peří vybarveno mnohem jednotvárněji. Mláďata jsou zbarvena méně

nápadně (Brown *et al.*, 1993). Horní část těla je hnědě proužkovaná, hlava šedohnědá, zobák šedivý a vak šedý až žlutý, na nohách převažuje šedá barva.

Žije ve vnitrozemských mokřinách, řekách, jezerech, při pobřeží i v deltách velkých řek v oblasti Středozemního a Černého moře (del Hoyo *et al.*, 1992). Kromě jihovýchodní Evropy se vyskytuje také v jižní a jihozápadní Asii a v severovýchodní Africe. Většina světové populace pelikánů kadeřavých hnízdí v jihovýchodním Kazachstánu, Turecku a Řecku (Batbayar *et al.*, 2007).



**Obr. 1:** Pelikán kadeřavý (*Pelecanus crispus*) ve svatební šatu

Zdroj: [http://www.birding.in/images/Birds/dalmatian\\_pelican.jpg](http://www.birding.in/images/Birds/dalmatian_pelican.jpg)

Pro potravu v době hnízdění létá 10 až 50 km, tedy blíže od hnízdní kolonie než pelikán bílý, který létá pro potravu až 100 km daleko (Nelson, 2005). Živí se převážně rybami, kterých denně spotřebuje jeden až dva kilogramy. Obvykle loví sami, ve dvojicích nebo trojicích. Při skupinovém lovu vytvářejí půlkruhy a stejně jako většina pelikánů zahánějí ryby na mělčinu úderem svých křídel o vodní hladinu (Naumov, 1955). Ve vnitrozemských sladkovodních biotopech jsou jejich hlavní potravou kapr (*Cyprinus*), okoun (*Perca*) nebo plotice (*Rutilus*) (Brown *et al.*, 1993), v oblastech s brakickou vodou jsou to úhoř (*Anguilla*), parmice (*Mugil*), hlaváč (*Gobius*) nebo jehlice (*Belone*) (Nelson, 2005).

Hnízdo buduje samice, zatímco samec až čtyřicetkrát denně přináší jemné trávy, rákos, řasy nebo různé listy. Tento materiál určený ke stavbě hnízda přepravuje ve vaku (Nelson, 2005). Hnízdo má 0,5-1,5 metru v průměru. Staví jej narozdíl od jiných druhů pelikánů na zemi (Schreiber, 1994). Bývá umístěno alespoň jeden metr nad vodní hladinou, aby se zabránilo jeho náhlému zaplavení v případě zvýšeného stavu vody. Hnízdo je dokončeno za tři až pět dnů, první vejce do něj samice naklade den nebo dva poté (Nelson, 2005). Klade jedno až šest vajec, nejčastěji však dvě (del Hoyo *et al.*, 1992). Délka inkubační doby se pohybuje v rozmezí mezi třiceti a třiceti čtyřmi dny.

Podle Světového svazu ochrany přírody (IUCN) je pelikán kadeřavý od roku 1994 zařazen v Červeném seznamu ohrožených druhů v kategorii zranitelný, kam byl přeřazen především z důvodu masivního úbytku přirozeného biotopu a ilegálnímu odstřelu (Anonymus, 2009). Aktuální počet volně žijících jedinců je odhadován na 10 až 20 tisíc ptáků. Nejrozsáhlejší kolonie o velikosti téměř 1000 párů se nacházejí u jezera Mikri Prespa v Řecku.

Pokles početnosti volně žijící populace je způsoben vysoušením, ničením mokřin, znečištěním vod, ve kterých pelikáni loví, a intenzivním lovem ryb v těchto oblastech. Další hrozbou je odstřel a pronásledování rybáři, kterým ptáci lovem ryb konkurují, ale také rušení turisty. Během posledních 15 let se záchraně pelikánů kadeřavých věnuje několik projektů v Evropě i Asii a také díky tomu se podle dostupných údajů některé kolonie již začínají zvětšovat.

Mongolská populace je kromě úbytku přirozeného prostředí také ohrožena střílením ptáků nomádky kmeny, které využívají horní čelist na základě starých kmenových tradic (Batbayar *et al.*, 2007). Věří, že hřebelcování koní zobákem dodá zvířatům sílu a rychlost. V roce 2007 bylo možné na černém trhu koupit zobák pelikána kadeřavého za 10 koní a 30 ovcí. Tato cena je mnohem vyšší než před 10 lety, protože počet pelikánů od té doby poklesl a jejich ochrana je důslednější.

Bulharská populace je při poklesu vodní hladiny nejvíce ohrožena vybíráním a ničením hnízd divokými prasaty (Anonymus, 2009).

Pelikáni kadeřaví jsou již delší dobu chováni ve třech zoologických zahradách v naší republice, jedná se o ZOO Dvůr Králové, Podkrušnohorský zoopark Chomutov a ZOO Praha. V červnu roku 2009 začala s chovem pelikána kadeřavého i ZOO Ostrava, která získala 2 chovné páry z pražské zoologické zahrady (Havlíčková, 2009).

Nejpočetnější chov se nalézá ve Dvoře Králové, kde bylo k 31. 12. 2008 chováno 10 samic, 8 samců a 6 mláďat odchovaných během roku 2008 (Hofrichterová, 2009). Ve stejném období bylo v Praze chováno 8 samic a 9 samců. V Chomutově bylo ke dni 2. 3. 2010 chováno celkem 7 jedinců, z toho 2 hnízdící páry (Miroslav Brtnický, Podkrušnohorský zoopark Chomutov, osobní sdělení, 2010).

Univerzita Palackého v Olomouci spolupracuje se ZOO Dvůr Králové, a. s. na projektu určování pohlaví a paternity u pelikánů, plameňáků a brodivých ptáků. Pro určení paternity je v Laboratoři populační genetiky používána metoda amplifikace polymorfních mikrosatelitových lokusů pomocí *cross-species* PCR s primery navrženými primárně k amplifikaci mikrosatelitových oblastí DNA u jiných druhů ptáků.

### **3.2 Mimopárové chování a paternita u ptáků**

Na základě sociálního chování ptáků jsou rozlišovány různé typy partnerských svazků. Nejvíce druhů je monogamních, asi 3 % druhů žijí v polygamních společenstvích (polyandrie, polygynie, polygynandrie), některé druhy se mohou chovat i promiskuitně (Wink *et* Dyrzcz, 1999; Veselovský, 2001). Partnerské vztahy ptáků jsou ale obvykle mnohem složitější a mohou se lišit v závislosti na rozdílných ekologických podmínkách, délce hnízdění nebo potravní nabídce (Veselovský, 2001).

Pomocí molekulárních analýz bylo zjištěno, že pouze malé procento ptáků je monogamních nejen sociálně, ale i geneticky (Wink *et* Dyrzcz, 1999). Dochází u nich totiž k mimopárovým kopulacím (*extra-pair copulation*, EPC), které mohou vést k následnému mimopárovému oplodnění (*extra-pair fertilization*, EPF). Důsledkem EPF pak může být mimopárová paternita (*extra-pair paternity*, EPP), tedy jev, kdy se o mláďata stará stálý partner samice, který však není jejich biologickým otcem (Griffith *et al.*, 2002). Mezi vysoce promiskuitní druhy patří např. modropláštník nádherný (*Malurus cyaneus*), který asi v 72 % vychovává cizí mláďata, nebo strnad rákosní (*Emberiza schoeniclus*), u něhož je frekvence EPP vyšší než 55 %.

Výskyt mimopárové paternity se autoři různých prací snaží vysvětlit pomocí odlišných hypotéz, jejich přehled je uveden v souhrnném článku Griffith *et al.* (2002). Patří sem například dvě hypotézy plodnosti, kdy samice vyhledává jiného partnera aby se vyvarovala neplodnosti svého sociálního partnera. Dále je to hypotéza dobrých genů,

podle které samice vyhledává EPP, aby získala „dobré geny“ pro svá mláďata, nebo hypotéza přímé výhody, podle níž samice vyhledává EPP, aby pro svá mláďata získala prostředky, které využívá cizí samec.

Z výše uvedených teorií vyplývá, že EPC zvýhodňuje především samice. Samcům EPC zvyšuje rozmnožovací úspěšnost a také zdatnost (Veselovský, 2001). Aby promiskuitní samci zajistili výlučnou paternitu potomků svých sociálních partnerek, hlídají je v době páření nebo s nimi často kopulují. Opuštěná samice může být oplodněna cizím samcem, čímž záletný samec ztratí výlučnou paternitu u všech mláďat.

### 3.3 Repetitivní sekvence DNA

Genomy archeí a eubakterií jsou z velké části složeny z oblastí, které kódují proteiny nebo funkční RNA (Snustad *et* Simmons, 2009). U eukaryotních organismů je hustota genů a jiných jedinečných oblastí velmi variabilní, ale obecně nižší. Jedním z důvodů této nižší genové hustoty je výskyt velkého množství repetitivní DNA. Pro repetitivní DNA je charakteristický určitý opakující se motiv. Repetitivní oblasti mohou být v genomu náhodně rozptýleny nebo uspořádány tandemově za sebou (Campbell *et* Reece, 2006).

Rozptýlené repetice nemají opakované jednotky umístěny jednu za druhou, ale roztroušeny na různých místech genomu (Campbell *et* Reece, 2006). Tyto repetice se obvykle chovají jako transponovatelné elementy. Podle délky se dají rozdělit do dvou skupin (Carter, 2000). SINEs (*short interspersed repeats*), krátké rozptýlené repetice, mají jednotku repetice kratší než 500 bp. LINEs (*long interspersed repeats*), dlouhé rozptýlené repetice, mají jednotku repetice delší než 500 bp.

Tandemové repetitivní sekvence mají základní opakující se motiv umístěn bezprostředně za sebou (Campbell *et* Reece, 2006). Bývají také označovány jako satelitní DNA nebo VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*). Tandemové repetice můžeme dále rozdělit na satelity, minisatelity a mikrosatelity.

#### 3.3.1 Satelity

Satelity jsou tandemové repetitivní sekvence, jejichž základní motiv může být dlouhý až 5 Mbp (Amour *et al.*, 1999), nejčastější je však délka mezi 100 a 300 bp (Weising *et al.*, 2005). Počet opakování základního motivu bývá velmi vysoký, obvykle



se vyskytuje v 1000 až 100000 kopiích. Použití satelitů jako molekulárních markerů je v dnešní době spíše raritou.

### 3.3.2 Minisatelity

Minisatelity jsou tandemové repetitivní sekvence se střední délkou základního motivu, jehož délka může být 10 až 100 bp (Scribner *et* Pearse, 2000; Buschiazzo *et* Gemmel, 2006), nejčastěji však 10 až 60 bp (Flegr, 2009). Počet opakování závisí na délce základního motivu, ve srovnání se satelity je nižší. Při délce repetitivní jednotky 12-15 bp je to 10 až 100 kopií (Gregory, 2005).

Minisatelity tvoří tzv. hypervariabilní oblasti v genomu obratlovců, rostlin a hub (Zima *et al.*, 2004). Tyto hypervariabilní oblasti jsou vytvářeny vlastním minisatelitem a okolními jedinečnými sekvencemi DNA. Sekvence minisatelitu jsou velmi konzervativní, kdežto obklopující sekvence DNA mezi jednotlivými lokusy jsou odlišné. Proměnlivost mikrosatelitů není způsobena substitucemi bazí, ale rozdílným počtem jednotek, který je vysoce variabilní. Díky velkému polymorfismu jsou minisatelity hojně užívány jako molekulární markery například při určování paternity (Weising *et al.*, 2005).

### 3.3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou tandemové repetitivní sekvence, jejichž základní motiv je dlouhý 1 až 9 bp (Smith, 1997), obvykle však 1 až 6 bp (Tóth *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2002; Buschiazzo *et* Gemmel, 2006). Vzhledem ke své struktuře a tandemovému uspořádání jsou mikrosatelity také označovány jako krátké tandemové repetice, STRs (*short tandem repeats*), nebo repetice jednoduchých sekvencí, SSRs (*simple sequence repeats*) (Zima *et al.*, 2004).

Mikrosatelity nacházíme v genomech jak prokaryotických, tak eukaryotických organismů a zpravidla jsou přítomné ve větší míře než minisatelity (Šmarda *et al.*, 2005). Častěji se vyskytují v nekódujících sekvencích DNA, kde je vysoká rychlost mutací. Mikrosatelity obvykle vykazují vysoký stupeň délkového polymorfismu (Scribner *et* Pearse, 2000).

### 3.4 Dělení mikrosatelitů

Mikrosatelity bývají nejčastěji rozdělovány podle délky základního motivu na mononukleotidové, dinukleotidové, trinukleotidové, tetranukleotidové, pentanukleotidové a hexanukleotidové. Podle Wanga *et al.* (1994) lze v genomu eukaryot nejvíce ze všech mikrosatelitových sekvencí nalézt dinukleotidové základní motivy zastoupené ve 48 až 67 procentech. Nejčtenějším mikrosatelitem u savců je dinukleotidová repetice CA, respektive TG tvořící 57 % všech nukleotidů (Flegr, 2009). Tato repetice se vyskytuje dvakrát častěji než AT/TA a třikrát častěji než AG/TC (Zima *et al.*, 2004). Velmi málo se naopak vyskytuje repetice CG (Tóth *et al.*, 2000). Z trinukleotidových repetic jsou u živočichů nejběžnější CAG, u rostlin jsou to AAG a CCG (Li *et al.*, 2002). Spíše zřídka se vyskytují repetice ACG a ACT (Tóth *et al.*, 2000).

Podle jiného kritéria můžeme mikrosatelity rozdělit na jednoduché, přerušované a složené (Oliveira *et al.*, 2006). U jednoduchého typu je opakován jediný motiv repetice, který není nijak přerušen. O přerušovaný typ SSR se jedná, je-li repetice v jednom nebo více místech narušena krátkou nukleotidovou sekvencí nebo jinou repetitivní jednotkou. V případě, že je SSR tvořen dvěma nebo více různými sekvencemi nukleotidů, z nichž každá má jiný základní motiv repetice, označujeme takový mikrosatelit jako složený.

### 3.5 Původ, evoluce a mutace mikrosatelitů

Původ mikrosatelitů je v současné době stále předmětem mnoha diskuzí. Aktuálně známá data naznačují dvě možné cesty jejich vzniku (Buschiazzo *et al.*, 2006). Předpokládá se, že mohly vzniknout spontánně z jedinečných sekvencí (*de novo*) nebo mohou být za jejich vytvoření zodpovědné transponovatelné elementy SINE a LINE.

Mikrosatelity se rychle vyvíjejí v důsledku vysoké rychlosti spontánních mutací, ke kterým u nich dochází (Anmarkrud *et al.*, 2008). Za nejčastější mechanismus ovlivňující vznik mutací a tím i velkou variabilitu mikrosatelitových lokusů je považováno sklouznutí (*slippage*) DNA polymerázy při replikaci nebo opravě poškozené DNA. Při tomto sklouznutí dojde ke zřejmému posunu disociovaných vláken a jejich chybné reasociaci v oblasti tandemově uspořádaných repetic, mikrosatelit tak může získat nebo ztratit jednu či více kopií základního motivu. Mutace

mikrosatelitů mohou být rovněž způsobeny nerovnoměrným crossing-overem, substitucemi nukleotidů nebo duplikacemi (Hancock, 1999).

Rychlost mutací mikrosatelitových oblastí je odhadována na  $10^{-2}$  až  $10^{-6}$  na lokus na generaci, je tedy mnohem vyšší než rychlost bodových mutací v oblastech kódujících geny (Anmarkrud *et al.*, 2008). Mutační rychlost mikrosatelitů závisí na jejich celkové velikosti a velikosti základního motivu (Hancock, 1999; Buschiazzo *et Gemmell*, 2006). Delší nepřerušené lokusy mutují mnohem častěji než krátké, vyšší mutační rychlost vykazují dinukleotidové motivy než trinukleotidové nebo tetranukleotidové (Hancock, 1999; Buschiazzo *et Gemmell*, 2006). Rychlost mutací může být také ovlivněna pohlavím nebo obsahem G/C bazí (Anmarkrud *et al.*, 2008).

### 3.6 Principy hledání nových mikrosatelitových lokusů

Při hledání nových mikrosatelitových lokusů u druhů, u nichž tyto oblasti DNA dosud nejsou známy je možné postupovat dvěma způsoby. Prvním z nich je izolace mikrosatelitů *de novo* z DNA daného druhu (Zane *et al.*, 2002), druhý využívá amplifikace mikrosatelitů metodou *cross-species* PCR (Primmer *et al.*, 1996).

Při izolaci *de novo* jsou mikrosatelity získávány z genomických knihoven daného druhu (Zane *et al.*, 2002). Existuje několik modifikací izolace mikrosatelitů *de novo*, které se ale zásadně neliší od základního izolačního postupu, který je následující:

- izolace genomické DNA zkoumaného druhu a její restrikce pomocí restrikčních endonukleáz (nejčastěji *RsaI* a *HaeIII*) nebo ultrazvukem
- separace vzniklých restričních fragmentů elektroforézou v agarózovém gelu a selekce fragmentů o velikosti 300-700 bp
- vložení fragmentů do plazmidového vektoru a transformace vektoru do kompetentních bakteriálních buněk
- testování přítomnosti klonů obsahujících mikrosatelitové repetice a jejich selekce na základě hybridizace se značenou sondou
- namnožení pozitivních klonů a jejich sekvenace
- navržení specifických primerů dle jedinečných sekvencí ohraničujících mikrosatelit

Izolování mikrosatelitů *de novo* je náročné časově i finančně. Pokud jsou již popsány mikrosatelitové lokusy u druhů fylogenticky spřízněných se zkoumaným druhem, je často lepší využít metody *cross-species* PCR amplifikace těchto lokusů. *Cross-species* PCR spočívá v amplifikaci mikrosatelitových lokusů pomocí primerů navržených primárně pro jiný (tzv. zdrojový) druh. Tuto techniku je možné použít u druhů blízce fylogeneticky příbuzných se zdrojovým druhem (Primmer *et al.*, 2005). Při rostoucí fylogenetické vzdálenosti se v jedinečných sekvencích přiléhajících k mikrosatelitům hromadí mutace, primery nemohou dostatečně hybridizovat s těmito mutovanými oblastmi a dochází k inhibici PCR amplifikace (Primmer *et al.*, 1996).

Při hledání mikrosatelitových lokusů *de novo* i pomocí *cross-species* PCR amplifikace je třeba nejprve otestovat, zda je nový mikrosatelit polymorfní. U polymorfních mikrosatelitů jsou optimalizovány podmínky PCR amplifikace a doba elektroforetické separace pro konkrétní mikrosatelitový lokus za účelem co nejlepšího rozlišení jednotlivých alel. Následně jsou zjištěny kvalitativní charakteristiky na základě počtu alel a četnosti výskytu jednotlivých genotypů. Dále je stanovena očekávaná heterozygotnost  $H_0$ , frekvence genotypů a jejich soulad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou či frekvence výskytu nulových alel.

### **3.7 Využití mikrosatelitů**

Variability v počtu repetitivních mikrosatelitů využívá v dnešní době mnoho biologických i lékařských oborů. Mikrosatelity jsou hojně využívanými molekulárními markery při populačně genetických, ekologických i fylogenetických studiích (Primmer *et al.*, 2005). Na polymorfismu mikrosatelitových lokusů je založena také diagnostika některých chorob (např. rakovina tlustého střeva) (Umetani *et al.*, 2000) nebo určování otcovství. Dále jsou využívány ve forenzní genetice při identifikaci jednotlivců nebo přiřazování biologických stop k obětem či pachatelům.

#### **3.7.1 Využití mikrosatelitů při paternitních studiích**

Jak již bylo výše uvedeno, využívají se mikrosatelity v mnoha různých odvětvích. Jednou z nejjednodušších aplikací je jejich využití při determinaci paternity (Ellegren, 1992). Alely mikrosatelitových lokusů jsou děděny podle Mendelovských zákonitostí,

je tedy děděna vždy jedna alela od každého rodiče. Výhodou mikrosatelitů oproti jiným markerům jejich kodominance, můžeme tedy rozlišit homozygota a heterozygota. Mikrosatelity mají optimální mutační rychlost vzhledem k jejich využití při paternitních studiích. Ačkoli mutují poměrně často, není to obvykle tak často, aby mládě mělo odlišnou (mutovanou) alelu, než jakou má jeden z jeho rodičů. Protože však k takovému jevu může výjimečně dojít, je vždy testováno více mikrosatelitových lokusů.

### 3.8 Využití *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů v ornitologii

Během posledních patnácti let se mikrosatelity staly jedním z nejčastěji využívaných molekulárních markerů v populačních studiích (Primmer *et al.*, 2005). Dříve bylo pro tyto účely používáno jen velmi omezené množství molekulárně biologických metod, např. DNA-DNA hybridizace, kterou postupně nahradily metody jako AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), studující polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů, nebo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), zkoumající polymorfismus náhodně amplifikované DNA.

U ptáků byla *cross-species* amplifikace mikrosatelitové DNA poprvé testována u 48 druhů z 23 ptačích čeledí s použitím primerů navržených podle DNA vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) a lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) (Primmer *et al.*, 1996). Stejně jako u savců bylo prokázáno, že s rostoucí fylogenetickou vzdáleností zdrojových a cílových druhů klesá počet polymorfních markerů, které se úspěšně amplifikují.

Širšímu využití *cross-species* amplifikace mikrosatelitů nahrává především fakt, že k testování stačí PCR a elektroforetická separace vzniklých produktů, jde tedy o poměrně levnou metodu. Nevýhodné je, že primery pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů nejsou univerzální (Primmer *et al.*, 2005), není tedy možné použít je u velkého množství různých druhů, protože úspěšnost amplifikace závisí na fylogenetické odlišnosti testovaného druhu a druhu, pro nějž byly primárně navrženy. Zvýšení pravděpodobnosti amplifikace i polymorfismu lokusů lze docílit snížením teploty hybridizace primerů. Dalším problematickým faktorem ovlivňujícím využití mikrosatelitů v ornitologii je nízká frekvence jejich výskytu v genomu ptáků, která je asi desetkrát nižší než u člověka nebo jiných savců (Primmer *et al.*, 1997).

Poměrně ucelená sada primerů, které lze univerzálně použít při amplifikaci mikrosatelitů, již byla popsána pro řád pěvců (Passeriformes). Mikrosatelity se tak stále více prosazují jako molekulární marker, který lze využít nejen při populačních studiích, ale také při srovnávání fylogenetické příbuznosti dvou či více druhů nebo při odhalování mezidruhové hybridizace (Primmer *et al.*, 2005).

### 3.8.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) je technika umožňující snadným a rychlým způsobem mnohonásobně amplifikovat zvolený úsek DNA *in vitro* při katalýze enzymem DNA polymerázou. Protože jde o velmi citlivou a specifickou techniku, je hojně využívána při analýze nukleových kyselin.

Základními složkami reakční směsi jsou templátová DNA, 2 krátké oligonukleotidové primery, DNA polymeráza a 4 deoxyribonukleosidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Pro správné fungování reakce jsou dále přidávány různé druhy pufrů podle typu použité DNA polymerázy a hořčnaté kationty ve formě MgCl<sub>2</sub>, celkový objem reakční směsi je doplněn deionizovanou vodou.

PCR sestává ze tří kroků, které se cyklicky opakují. Pro dostatečnou amplifikaci je obvykle třeba 25 až 35 cyklů. Prvním krokem je denaturace probíhající po dobu 20-30 sekund při teplotě 94-98 °C, dochází při ní k narušení vodíkových můstků a rozvolnění vláken dvoušroubovice molekuly DNA. Při dalším kroku je reakční směs ochlazená na 40-65 °C na 20-40 sekund, dochází k nasednutí a hybridizaci primerů na příslušná místa jednovláknové DNA. Posledním krokem je zvýšení teploty na 72 °C, aktivuje se tak DNA polymeráza a dochází k syntéze nových řetězců DNA s využitím energie vazeb molekul dNTP. Nový řetězec je syntetizován ve směru od 3'-konce primeru k 5'-konci templátu na základě komplementarity s templátovým vláknem. Syntézou nového řetězce je ukončen jeden cyklus PCR, další je navozen zvýšením teploty a denurací dvouvláknové DNA. Počet kopií DNA při roste exponenciálně, nově vzniklá dvoušroubovice DNA je vždy tvořena jedním templátovým a jedním nově nasyntetizovaným vláknem.

### 3.8.2 Elektroforetická separace PCR produktu

Elektroforetická separace je nejčastější metodou, která je využívána pro analýzu produktů PCR. Záporně nabitě molekuly DNA při ní putují v elektrickém poli směrem

k anodě a rozdělují se podle hmotnosti fragmentů, kratší části putují rychleji, delší pomaleji. Obvykle je prováděna separace v polyakrylamidovém gelu, někdy je také využíván gel agarózový. Vzniklé proužky jsou vizualizovány dusičnanem stříbrným, ethidium bromidem nebo různými druhy fluorescenčních barviv.

### 3.8.3 Problémy při hodnocení PCR produktů

Vyhodnocení PCR produktů na elektroforetogramu může zkomplikovat několik jevů. Jedná se zejména o přítomnost tzv. stutter bandů, mikrosatelitovou homoplazii a výskyt nulových alel v populaci.

#### Stutter bandy

Častým problémem při běžné gelové, ale i kapilární elektroforéze bývá přítomnost tzv. *stutter* bandů (*shadow bands*, *DNA polymerase slippage products*), které v jedné nebo více kopiích doprovázejí hlavní band určité alely (Walsh *et al.*, 1996). Tyto bandy vznikají v důsledku sklouznutí (*slippage*) DNA polymerázy při replikaci komplementárního vlákna v oblasti repetice (Daniels *et al.*, 1998). *Stutter* bandy jsou o něco kratší než hlavní produkt, u dinukleotidových repetic zpravidla o 2, 4, 6 a více bází (Walsh *et al.*, 1996). Na elektroforetogramu mívají slabší intenzitu a někdy také odlišné zbarvení než hlavní produkt. Nejhojněji se *stutter* bandy vyskytují u dinukleotidových repetic, méně bývají pozorovány u trinukleotidových a tetranukleotidových motivů (Daniels *et al.*, 1998). Interpretace výsledků může být problematická v případě alel podobné velikosti, kdy se *stutter* bandy jedné alely překrývají s hlavním produktem jiné alely (Walsh *et al.*, 1996).

#### Homoplazie alel

Jako alelová homoplazie je označován stav, při němž jsou alely jednoho lokusu délkově identické, vznikly však konvergentním vývojem, jejich původ se tedy liší (Estoup *et al.*, 2002).

Homoplazické alely je možné rodit do dvou skupin. První z nich jsou sice délkově stejné, ale liší se sekvencemi, dají se tedy odhalit pomocí sekvenování nebo metodou jednořetězcového konformačního polymorfismu (SSCP) (Angers *et al.*, 2000). Druhou skupinu tvoří alely, které vznikly odlišně, ale jsou stejně dlouhé a mají shodné sekvence. Tyto homoplazické alely je možné určit pouze hledáním mutací ve skupinách se známými příbuzenskými vztahy (Anmarkrud *et al.*, 2008).

Podle studie Estoup *et al.* (2002) alelová homoplazie nezpůsobuje při většině populačně genetických analýz velké problémy, protože je do jisté míry kompenzována vysokým stupněm variability mikrosatelitových lokusů. Pokud je testováno dostatečné množství mikrosatelitových lokusů, je možné její vliv obvykle zanedbat.

### **Nulové alely**

Nulová nebo také neamplifikující se alela je taková alela, kterou není možné amplifikovat prostřednictvím PCR tak, aby bylo možné úspěšně detekovat vzniklý PCR produkt (Dakin *et* Avise, 2004). Problémy při PCR amplifikaci jsou způsobeny bodovou mutací v jedinečných oblastech obklopujících mikrosatelit tzv. *flanking regions*, na které nasedají primery. Alela se neamplifikuje protože primer nemůže dostatečně hybridizovat s mutovanou sekvencí templátové DNA.

Nulové alely se často vyskytují při *cross-species* amplifikaci s primery navrženými pro jiné tzv. zdrojové druhy (Dakin *et* Avise, 2004). Tyto neamplifikované alely zdánlivě zvyšují poměr homozygotů v populaci a komplikují tak determinaci paternity, protože mohou způsobit nesprávné vyloučení heterozygotního otce (Jones *et* Ardren, 2003). Heterozygotní otec s nulovou alelou se při hodnocení PCR produktů jeví jako homozygot, který tak může být vyřazen z okruhu potenciálních biologických rodičů mláďete. Při paternitních studiích je proto obvykle testován větší počet mikrosatelitových lokusů, aby se takové chybě předešlo.

V případě podezření na přítomnost nulové alely je možné postupovat několika způsoby. Jednou z možností je testování mikrosatelitu u skupiny jedinců, jejichž příbuzenské vztahy jsou s jistotou známe (Callen *et al.*, 1993) a odhalení nulové alely na základě neodpovídajících alelových kombinací. U malých skupin testovaných jedinců lze genealogickými metodami zjistit možné segregace alel a vyvodit tak, zda se jedná o homozygota či heterozygota pro nulovou alelu (Dakin *et* Avise, 2004). V dnešní době přítomnost nulové alely nejlépe detekují počítačové programy, které statisticky vyhodnotí závažnost odchylek pozorované a očekávané heterozygotnosti a jiných populačních charakteristik. Např. program Cervus je schopen odhalit odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a upozorní uživatele na možnost nulové alely (Jones *et* Ardren, 2003).



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Vzorky krve byly odebrány pracovníky Zoologické zahrady Dvůr Králové, a.s. z tarzální žíly šesti nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Odebraná krev o objemu 20-100  $\mu$ l byla přidána do 2ml mikrozkušavek obsahujících 1 ml Queen's pufry (Seutin *et al.*, 1991).

### 4.2 Izolace genomické DNA pro PCR z ptačí krve

Tento postup byl převzat dle Maniatis *et al.* (1982) a upraven pro podmínky Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci.

#### 1. den

1. Do mikrozkušavek s 500  $\mu$ l roztoku krve v Queen's pufry bylo přidáno 100  $\mu$ l proteinázy K (10 mg/ml) a 100  $\mu$ l 10% roztoku SDS. Mikrozkušavky byly přes noc inkubovány v termostatu při teplotě 40 °C za stálého překlápění.

#### 2. den

2. Bylo přidáno 400  $\mu$ l fenolu a 400  $\mu$ l chloroformu a mikrozkušavky byly vortexovány a centrifugovány při 2000 g po dobu 5 minut.
3. Do nových mikrozkušavek byla odebrána horní fáze. Ke směsi bylo přidáno 700  $\mu$ l chloroformu, mikrozkušavky vortexovány a centrifugovány při 2000 g po dobu 5 minut. Tento krok byl ještě jednou zopakován.
4. K odebranému roztoku bylo přidáno 180  $\mu$ l vychlazeného octanu sodného (3 mol/l) a zbytek objemu mikrozkušavky byl doplněn vychlazeným 96% ethanolem. Směs byla promíchána překlápěním a mikrozkušavky uloženy na 2 hodiny do -20 °C.
5. Mikrozkušavky byly centrifugovány při 13000 g po dobu 30 minut. Ethanol byl opatrně slit a k sedimentu bylo přidáno 1 ml vychlazeného 70% ethanolu.

6. Mikroskopické vzorky byly centrifugovány při 13000 g po dobu 10 minut. Ethanol byl slit a obsah mikroskopických vzorků vysušen v termobloku. K vysušené DNA bylo přidáno 500 µl TE pufru a byla přes noc rozpuštěna v termostatu při teplotě 40 °C za stálého překlápění.

### 3. den

7. Po fluorometrickém stanovení koncentrace byl roztok DNA v mikroskopické vzorkovce zamražen v -20 °C. Část byla pro použití při PCR odebrána, naředěna deionizovanou vodou na koncentraci 30-50 µg/ml a uchována v lednici.

## 4.3 Hledání vhodných mikrosatelitových markerů pro pelikána kadeřavého metodou *cross-species* PCR

Dosud nebyla publikována žádná práce popisující mikrosatelitové lokusy u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*), zaměřila jsem se proto při výběru primerů vhodných pro hledání polymorfních mikrosatelitů metodou *cross-species* PCR amplifikace na zdrojové druhy z řádů považovaných za fylogeneticky příbuzné, ale také na velké vodní ptáky z řádů tradičně pokládaných za pelikánům nepřibuzné.

Primery amplifikující polymorfní mikrosatelitové lokusy byly navrženy pro dva zástupce rodu pelikán - pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*). Kromě pelikána bílého jsem z řádu veslonozí (Pelecaniformes) vybrala tyto zdrojové druhy: fregatku malou (*Fregata minor*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), tereje červenonohého (*Sula sula*), tereje guánového (*Sula variegata*) a tereje modronohého (*Sula nebouxii*).

Molekulární analýzy Nádvořníka *et al.*, (2008) naznačují fylogenetickou příbuznost pelikánů také s řády brodiví (Ciconiiformes) a plameňáci (Phoenicopteriformes). Proto jsem vybrala primery izolované z DNA těchto zástupců: čápa bílého (*Ciconia ciconia*), ibise čínského (*Nipponia nippon*), kolpíka malého (*Platalea minor*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) z řádu brodiví; plameňáka karibského (*Phoenicopus ruber ruber*) a plameňáka růžového (*Phoenicopus roseus*) z řádu plameňáci.

Řády tučňáci (Sphenisciformes) a potáplice (Gaviiformes) mají podle posledních studií s pelikány společného předka (Hackett *et al.*, 2008; Mayr, 2008). Testovala jsme proto 7 párů primerů od potáplice lední (*Gavia immer*). Vybrala jsem také 1 pár primerů od tučňáka kroužkového (*Pygoscelis alieliae*), který amplifikoval polymorfni lokus u ibise posvátného (*Threskiornis aethiopicus*) z řádu brodiví (Wilson, 2008), který je s pelikány příbuzný.

Kromě fylogeneticky blízkých řádů jsem pro testování vybrala 2 páry primerů od alkounka drobného (*Aethia pygmaea*) z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), který není považován za příbuzný s pelikány (Hackett *et al.*, 2008; Mayr, 2008). PCR produkty amplifikované těmito primery však byly polymorfni u faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*) a fregatky vznešené (*Fregata magnificens*) z řádu veslonozí (Dawson *et al.*, 2005).

Pro testování jsem zvolila i zdrojové druhy z řádů vrubozobí (Anseriformes), se kterými by pelikán kadeřavý neměl být fylogeneticky spřízněn (Hackett *et al.*, 2008; Nádvořník *et al.*, 2008). Jednalo se o kachnu divokou (*Anas platyrhynchos*), kachnici laločnatou (*Biziura lobata*), kajku mořskou (*Somateria mollissima*) a pižmovku velkou (*Cairina moschata*).

Přehled všech testovaných mikrosatelitových lokusů, zdrojových druhů a autorů, kteří tyto lokusy publikovali, je uveden v Tab.1.

**Tab. 1:** Přehled testovaných mikrosatelitových lokusů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Jednotlivé sloupce uvádějí: řád, zdrojový druh, názvy příslušných mikrosatelitových lokusů, autora a rok publikace.

Řád	Zdrojový druh	Testované mikrosatelitové lokusy	Autor, rok publikace
<b>Brodiví</b> ( <b>Ciconiiformes</b> )	Čáp bílý ( <i>Ciconia ciconia</i> )	Cc01, Cc02, Cc03, Cc04, Cc05, Cc06, Cc07	Shephard <i>et al.</i> , 2009
		CC1, CC3, CC7, CC9, CC10, CC13	Gernot Segelbacher, ústní sdělení
	Ibis čínský ( <i>Nipponia nippon</i> )	Nn04	He <i>et al.</i> , 2006

**Tab. 1 – pokračování:**

Řád	Zdrojový druh	Testované mikrosatelitové lokusy	Autor, rok publikace
<b>Brodiví (Ciconiiformes)</b>	Kolpík malý ( <i>Platalea minor</i> )	PM1-4, PM2-16, PM2-20, PM2-21, PM2-28, PM2-29, PM2-37, PM2-62, PM2-68, PM2-80, PM3-13, PM3-15, PM3-16, PM3-17, PM3-20, PM3-22, PM3-25, PM1-13, PM1-17, PM2-14, PM3-28, PM3-29, PM3-31	Yeung <i>et al.</i> , 2009
	Kvakoš noční ( <i>Nycticorax nycticorax</i> )	nycti14, nycti15, nycti22, nycti26, nycti35, nycti36, nycti41, nycti43, nycti62, nycti68, nycti74	Chang <i>et al.</i> , 2009
	Volavka žlutozobá ( <i>Egretta eulophotes</i> )	Ae01, Ae04, Ae05, Ae09, Ae13, Ae24, Ae25, Ae26, Ae27, Ae28, Ae30, Ae35, Ae36, Ae37, Ae38, Ae42, Ae44, Ae47	Huang <i>et al.</i> , 2009
<b>Dlouhokřídlí (Charadriiformes)</b>	Alkounek drobný ( <i>Aethia pygmaea</i> )	Apy06, Apy07	Dawson <i>et al.</i> , 2005
<b>Plameňáci (Phoenicopteriformes)</b>	Plameňák růžový ( <i>Phoenicopterus 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
	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopterus ruber ruber</i> )	Pruμ7, Pruμ8, Pruμ9	Kapil <i>et al.</i> , 2010
		Pruμ13	Preston, 2005
<b>Potáplice (Gaviiformes)</b>	Potáplice lední ( <i>Gavia immer</i> )	GimA9EPA, GimA12EPA, GimC5EPA, GimC11EPA, GimD9EPA, GimE11EPA, GimD12EPA	McMillan <i>et al.</i> , 2004
<b>Tučňáci (Sphenisciformes)</b>	Tučňák kroužkový ( <i>Pygoscelis alieliae</i> )	AM13	Roeder <i>et al.</i> , 2001
<b>Veslonoží (Pelecaniformes)</b>	Fregatka malá ( <i>Fregata minor</i> )	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18	Deaborn <i>et al.</i> , 2008

**Tab. 1 – pokračování:**

Řád	Zdrojový druh	Testované mikrosatelitové lokusy	Autor, rok publikace
Veslonozí (Pelecaniformes)	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	COR01, COR03, COR05, COR06, COR07, COR12, COR15, COR17, COR19, COR20, COR21, COR22, COR23, COR26, COR28, COR30, COR31, COR35, COR38, COR39, COR40, COR41, COR43, COR45, COR47	Fike <i>et al.</i> , 2009
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax</i> )	Dcco-01, Dcco-02, Dcco-03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08	Mercer <i>et al.</i> , 2010
	Pelikán bílý ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	PEL304	De Ponte Machado <i>et al.</i> , 2008
	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> )	BOOB-RM2-F07, BOOB-RM3-D07, BOOB-RM3-F11, BOOB-RM4-A08, BOOB-RM4-B03, BOOB-RM4-C03, BOOB-RM4-D07, BOOB-RM4-E03, BOOB-RM4-E10, BOOB-RM4-F11, BOOB-RM4-G03	Faircloth <i>et al.</i> , 2009
		Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B-100	Taylor <i>et al.</i> , 2010
Vrubozobí (Anseriformes)	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
	Pižmovka velká ( <i>Cairina moschata</i> )	CmAAT16, CmAAT35, CmAAT38	Stai <i>et Hughes</i> , 2003

### 4.3.1 PCR amplifikace mikrosatelitové DNA

Jednotlivé složky reakční směsi uvedené níže byly napipetovány do 1,5ml mikrozkušavky, jako poslední byla přidána DNA polymeráza. Mikrozkušavky poté byly vortexovány a krátce centrifugovány. Takto připravená reakční směs byla po 9  $\mu$ l rozpipetována do mikrozkušavek s 1  $\mu$ l DNA o koncentraci 10-50  $\mu$ g/ml.

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

deionizovaná voda	42,50 $\mu$ l
reakční pufr (10 x)	6,70 $\mu$ l
roztok $MgCl_2$	3,75 $\mu$ l
roztok dNTPs (25 nmol/l)	0,65 $\mu$ l
primer F (10 $\mu$ mol/l)	3,10 $\mu$ l
primer R (10 $\mu$ mol/l)	3,10 $\mu$ l
DNA polymeráza (5 U/ $\mu$ l)	0,40 $\mu$ l

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

5 min:	94 °C	} 35 cyklů
30 s:	94 °C	
30 s:	teplota dle tabulky 2	
30 s:	72 °C	
7 min:	72 °C	

Základní teplota nasedání primerů byla stanovena na 48 °C, aby primery co nejlépe hybridizovaly s templátovou DNA.

### 4.3.2 Zpracování PCR produktů

Postup byl 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.

## **Příprava 6% polyakrylamidového gelu**

1. Větší sklo bylo vydrhnuto kartáčem a omyto deionizovanou vodou. Strana, která se dotýká gelu byla ošetřena 96% ethanolem a přípravkem k odpuzování vody ze skel automobilů (Clear Vue), který byl rozetřen a ponechán zaschnout. Po zaschnutí přípravku bylo sklo omyto deionizovanou vodou a osušeno.
2. Kratší sklo bylo omyto vodou se saponátem, vydrhnuto kartáčem, opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno. Strana, která se dotýká gelu byla ošetřena roztokem 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Po zaschnutí roztoku bylo sklo čtyřikrát ořeno 96% ethanolem a osušeno.
3. Na větší sklo byly po stranách umístěny 0,4 mm silné spacers, na které bylo položeno menší sklo. Skla byla složena ošetřenými plochami dovnitř a zafixována svorkami.
4. Gel byl připraven smícháním všech složek (viz. Použité roztoky) v kádince, promíchán krouživým pohybem a poté nalit mezi skla. Do prostoru mezi skly byl vsunut hřebínek rovnou stranou asi 0,5 cm hluboko. Hřebínek byl zafixován svorkami a gel ponechán alespoň 45 minut polymerizovat.

## **Elektroforetická separace PCR produktů**

1. Po ztuhnutí gelu a odstranění svorek byla skla omyta od zbytků gelu, osušena a upevněna do elektroforetické komůrky. Elektrodové prostory byly zality 0,5 x TBE pufrem, hřebínek vytažen a prostor mezi skly promyt pufrem z injekční stříkačky. Prostory elektrod byly uzavřeny a nasazeny elektrody. Zdroji stejnosměrného elektrického proudu byl nastaven na výkon 90 W (elektrický proud a napětí na maximální hodnoty 150 mA a 3000 V). Gel byl ponechán předeheat přibližně 30 minut.
2. Během nahřívání gelu byly PCR produkty smíchány s nanášcím pufrem v poměru 2:1 a ponechány denaturovat v termocykléru, pro zabránění renaturace byly vzorky ochlazeny v ledové tříšti.
3. Během denaturace byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojena katoda, otevřen katodový prostor, prostor mezi skly promyt pufrem a mezi skla vsunut hřebínek zoubky do gelu.
4. Mezi zoubky hřebínku byly nanášeny 2  $\mu$ l směsi PCR produktů s nanášecím pufrem. Po napipetování vzorků byl katodový prostor uzavřen, nasazena katoda

a zdroj stejnosměrného elektrického proudu nastaven na výkon 70 W (elektrický proud a napětí zůstaly nastaveny na maximální hodnoty 150 mA na 3000 V). Čas separace PCR produktů byl optimalizován tak, aby bylo u polymorfních produktů možné co nejlépe rozlišit jednotlivé alely, obvyklá doba separace byla 90 až 180 minut.

### **Vizualizace elektroforetogramu**

1. Během elektroforetické separace byly připraveny roztoky pro vymývání gelu a následnou vizualizaci separovaných PCR produktů (složení viz. Použité roztoky).
2. Po elektroforetické separaci PCR produkty byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojeny elektrody a vypuštěn pufr z katodového prostoru. Skla byla vyjmuta z elektroforetické komůrky, opláchnuta deionizovanou vodou, odstraněny spacery i hřebínek a skla opatrně oddělena.
3. Menší sklo bylo gelem nahoru umístěno do fotomisky na třepačku a zalito fix/stop roztokem. Po 20 minutách resp. vymytí pruhu xylenové modře byl roztok slit do baňky a sklo s gelem třikrát promyto v deionizované vodě.
4. Sklo s gelem bylo umístěno na třepačku a ponecháno 5 minut v roztoku  $\text{HNO}_3$ , poté bylo čtyřikrát promyto v deionizované vodě.
5. Sklo s gelem bylo umístěno na třepačku do roztoku  $\text{AgNO}_3$  alespoň po dobu 25 minut, poté bylo opláchnuto v deionizované vodě a přemístěno do fotomisky s vývojkou na třepačce, kde se sledovalo vyvíjení hnědočerných proužků PCR produktů.
6. Když byly proužky dostatečně zřetelné, bylo vyvíjení zbarvení zastaveno přilítím fix/stop roztoku z kroku 3. Sklo s gelem bylo na 2 minuty ponořeno do deionizované vody a ponecháno 30 minut v sušárně při 60 °C.
7. Po vysušení bylo sklo označeno a vyhodnoceno na negatoskopu. Pro uchování elektroforetogramu bylo sklo s gelem naskenováno.
8. Sklo s nepotřebným gelem bylo na několik desítek minut až několik hodin ponořeno do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l, v němž se gel odlepil od skla. Sklo bylo umyto a připraveno k dalšímu použití.



#### 4.4 Použité chemikálie

Akrylamid (Serva)  
aTaq DNA polymeráza (5U/ $\mu$ l), M1241 (Promega)  
Bromfenolová modř (Serva)  
Deionizovaná voda  
Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400  $\mu$ l každého), U1240 (Promega)  
Dusičnan stříbrný (Lachema)  
Ethanol – 96% roztok (Seliko Olomouc)  
Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na<sub>2</sub>EDTA) (Lachema)  
Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)  
Fenol (Sigma)  
Formaldehyd (Lachema)  
Formamid (AppliChem)  
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'-metylenbisakrylamid (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)

## 4.5 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 trishydroxymethylaminometanu (Tris)  
55 g kyseliny borité  $H_3BO_3$   
40 ml roztoku  $Na_2EDTA$  0,5 mol/l, pH 8,0  
rozpuštit v 800 ml deionizované vody  
doplnit deionizovanou vodou na 1 l

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

1 g  $(NH_4)_2S_2O_8$   
rozpuštit 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 peroxodisíranu 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

## 4.6 Laboratorní přístroje

Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)  
Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)  
Chladnička kombinovaná (Whirpool)  
Laboratorní váhy EK-200g (AND)  
Magnetická míchačka RCTbasic (Ika)  
Mikropipety Finnpiquette 0,5 až 10  $\mu$ l (osmikanálová) a 0,3  $\mu$ l až 1 ml (Labsystems)  
Mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu$ l až 1 ml (Nichiryo)  
Minicentrifuga Spectrafuge Mini (Labnet)  
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 (Bioteca)  
Termocyklér XP Thermal Cycler (BIOER technology)  
Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)  
Vortex MS2 (Ika)  
Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)  
Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

## **5 Výsledky**

















## **6 Diskuze**













## 7 Závěr

Náplní této bakalářské práce bylo nalezení polymorfních mikrosatelitových lokusů vhodných pro determinaci paternity u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). K tomuto účelu byla použita metoda *cross-species* PCR amplifikace s primery navrženými pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitových lokusů u fylogeneticky příbuzných i nepříbuzných skupin ptáků. Testování probíhalo s DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého. Krevní vzorky, ze kterých byla DNA izolována, dodala ZOO Dvůr Králové.

Testováním 223 párů primerů jsem našla 11 polymorfních lokusů. Nalezené polymorfní lokusy byly amplifikovány primery navrženými primárně pro zástupce řádů Phoenicopteriformes, Pelecaniformes, Ciconiiformes a Chadriformes. Polymorfní lokusy měly od 2 do 6 alel a jejich průměrná heterozygotnost byla 0,36.

Tyto polymorfní lokusy je možné využít při následných studiích paternity pro potřeby zoologických zahrad a záchranných odchovů, mohou také sloužit ke studiu struktury populací za účelem ochrany pelikána kadeřavého nebo při jeho reintrodukci do přírodních biotopů.

Ve své diplomové práci bych ráda navázala na toto téma, otestovala nalezené polymorfní lokusy u větší skupiny nepříbuzných jedinců a poté provedla analýzu paternity u chovné skupiny pelikána kadeřavého ze Zoologické zahrady Dvůr Králové, a.s. Také bych se ráda věnovala studiu fylogenetického postavení pelikána kadeřavého.

## 8 Seznam zkratek

A	adenin
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
bp	pár bází ( <i>base pair</i> )
C	cytozin
dATP	deoxyriboadenozin trifosfát
dCTP	deoxyribocytidin trifosfát
dGTP	deoxyriboguanidin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dTTP	deoxyribotymidin trifosfát
G	guanin
H <sub>o</sub>	pozorovaná heterozygotnost ( <i>observed heterozygosity</i> )
LINE	dlouhá rozptýlená repetice ( <i>long interspersed element</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
SINE	krátká rozptýlená repetice ( <i>short interspersed element</i> )
SSR	repetice jednoduchých sekvencí ( <i>simple sequence repeats</i> )
T	tymín
VNTR	variabilní počet tandemových repeticí ( <i>variable number of tandem repeats</i> )

## 9 Použitá literatura

- Alderton D (1995): Ptáci. Překlad z anglického originálu. Nakladatelský dům OP, Praha, 108 s.
- Angers B, Estoup A, Jarne P (2000): Microsatellites size homoplasy, SSCP, and population structure: a case study in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1926-1932.
- Anmarkrud JA, Kleven O, Bachmann L, Lifjeld JT (2008): Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus *HrU10*. *BMC Evolutionary Biology* 8, 138.
- Anonymous (2009): *Pelecanus crispus*. In: IUCN 2009. BirdLife International 2009. IUCN Red List of Threatened Species. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- 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, 352 s.
- Batbayar N, Bräunlich A, Natsagdorj T, Setev S, Sovd G (2007): Conservation of the critically endangered east Asian population of Dalmatian Pelican *Pelecanus crispus* in western Mongolia, Project Report. *Birding ASIA* 7, 68-74.
- Bouchner M (1972): Kapesní atlas ptáků. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 251 s.
- Brown LH, Urban EK, Newman K (1993): The birds of Africa. Vol. 1, Academic Press, London, 669 s.
- Buschiazzo E, Gemmel NJ (2006): The rise, fall and the renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28, 1040-1050.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR (1993): Incidence and origin of „null“ alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* 52, 922-927.
- Campbell NA, Reece JB (2006): Biologie. Computer Press, Brno, 1332 s.
- Carter RE (2000): DNA Fingerprinting using Minisatellite Probes. In: Baker AJ (Ed.): *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science, Oxford, 337 s.
- Chang Q, Xie Z, Li Q, Zhou K (2009): Microsatellite loci developed for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservation Genetics* 10, 1537-1540.
- 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.
- Dawson DA, Hunter FM, Pandhal J, Buckland R, Parham A, Jones IL, Bradshaw M, Jehle R, Burke T (2005): Assessment of 17 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5-15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes* 5, 289-297.
- Dearborn DC, Hailer F, Fleischer RC (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* 8, 1399-1401.
- Del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona, 696 s.
- Dungel J, Hudec K (2001): Atlas ptáků české a slovenské republiky, 1. vydání. Academia, Praha, 249 s.
- Ellegren H (1992): Polymerase-Chain-Reaction (PCR) Analysis of Microsatellites: A New Approach to Studies of Genetic Relationships in Birds. *The Auk* 4, 886-895.
- Estoup A, Jarne P, Cournet J-M (2002): Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.
- Faircloth BC, Ramos A, Drummond H, Gowaty PA (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *Conservation Genetics* 1, 159-162.
- Fike JA, Devault TL, Rhoades OE (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* 9, 1183-1185.
- Flegr J (2009): Evoluční biologie, 2. opravené a rozšířené vydání. Academia, Praha, 569 s.
- Gaisler J, Zima J (2007): Zoologie obratlovců, 2. přepracované vydání. Academia, Praha, 692 s.
- Geraci J, Gaillard M, Bechnet A, Cezilly F, Wattier RA (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, **preprint**.
- Gregory TR (2005): The evolution of the genome. Elsevier Academic Press, London, 740 s.
- 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 PJ, 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.

- Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, Braun MJ, Chojnowski JL, Cox WA, Han KL, Harshman J, Huddleston CJ, Marks BD, Miglia KJ, Moore WS, Sheldon FH, Steadman DW, Witt CC, Yuri T (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* 320, 1763-1768.
- Hanzák J, Hudec K (1974): Světem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci. Albatros, Praha, 497 s.
- Hancock JM (1999): Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In *Microsatellites: Evolution and applications*. Eds: Goldstein D, Schlötterer C. Oxford University Press, New York, 352 s.
- Havlíčková I (2009): V zoo mají nejvzácnějšího pelikána. *Moravskoslezský deník*.
- Hedges SB, Sibley CG (1994): Molecules vs. morphology in avian evolution: The case of the "pelecaniform" birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9861-9865.
- Hickman CR, Peters MB, Crawford NG, Hagen C, Glenn TC, Somers CM (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* 8, 1439-1441.
- Hofrichterová A (2009): Ročenka Unie českých a slovenských zoologických zahrad 2008. Reprocolor, s.r.o, Praha.
- Huang X, Zhou X, Chen M, Fang W, Chen X (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics*, **in press**.
- Jones AG, Ardren WR (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12, 2511-2523.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007): Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16, 1099-1106.
- Kapil R, Sawyer GM, Preston L, Benjamin RC (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*), **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.
- Maak S, Neumann K, von Lengerken G, Gattermann R (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics* 3, 233.
- Maak S, Wimmers K, Weigend S, Neumann K (2003): Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 3, 224-227.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982): *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Mayr (2008): Avian higher-level phylogeny: well-supported clades and what we can learn from a phylogenetic analysis of 2954 morphological characters. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 1, 63-72.
- McMillan AM, Bagley MJ, Evers DC (2004): Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). *Molecular Ecology Notes* 4, 297-299.
- Mercer DM, Haig SM, Mullins TD (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources*, **in press**.
- 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*, **preprint**.
- Nádvorník P, Drobek A, Čihák K: (2008) Microsatellite markers for the study of paternity in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*) and Caribbean Flamingo (*P. ruber*). *Journal of Agrobiology* 25, 93-96.
- Naumov SP (1955): Zoologie obratlovců, 1. vydání. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 490 s.
- Nelson JB (2005): Pelicans, Cormorants, and their Relatives. The Pelecaniformes, 1st ed. Oxford University Press, Oxford, 661 s.
- 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.
- 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, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merilä J (2005): Factors affecting avian *cross-species* microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36, 348-360.
- Primmer CR, Raudsepp T, Chowdhary BP, Møller AP, Ellegren H (1997): Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research* 7, 471-482.
- Ranochová A (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.



- Raymond M, Rousset F (1995): GenePop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.
- Roeder AD, Marshall RK, Mitchelson AJ, Visagathilagar T, Ritchie PA, Love DR, Pakai TJ, McPartlan HC, Murray ND, Robinson NA, Kerry KR, Lambert DM (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology* 10, 1645–1656.
- 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, 337 s.
- Seutin G, White BN, Boag PT (1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69, 82-90.
- Schreiber EA (1994): Pelikáni a jejich příbuzní. In: Homolová Š (Ed.): *Obratlovci: savci, ptáci, obojživelníci, plazi: encyklopedický průvodce světem zvířat*, 1. vydání. Nakladatelský dům OP, Praha, 687 s.
- Smith AD (Ed.) (1997): *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, Oxford, 738 s.
- Snustad DP, Simmons MJ (2009): *Genetika*, 1. vydání. Masarykova univerzita, Brno, 871 s.
- Stai SM, Hughes CR (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics* 5, 387-389.
- Stephard JM, Galbusera P, Hellemans B, Jusic A, Akhandaf Y (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics* 10, 1525-1528.
- Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V (2005): *Metody molekulární biologie*. Vydavatelství MU, Brno, 188 s.
- Taylor SA, Morris-Pocock JA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxi*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151, 525-528.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- Umetani N, Sasaki S, Watanabe T, Ishigami H, Ueda E, Nagawa H (2000): Diagnostic Primer Sets for Microsatellite Instability Optimized for a Minimal Amount of Damaged DNA From Colorectal Tissue Samples. *Annals of Surgical Oncology* 7, 276–280.
- Veselovský, Z. (2001): *Obecná ornitologie*. Academia, Praha, 360 s.
- 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, 472 s.
- Wilson R (2008): Sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) – Modern samples. Summer Project. Massey University, Albany.
- Wink M, Dyrce A (1999): Mating systems in birds: a review of molecular studies. *Acta Ornithologica*, 34, 91-109.
- Yeung CKL, Hsu Y-C, Yao C-T, Li S-H (2008): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics* 10, 1081-1084.
- 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, 239 s.