

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

GENETICKÁ VARIABILITA U VYBRANÝCH DRUHŮ
OHROŽENÝCH ŽELV V ZOOLOGICKÝCH
ZAHRADÁCH

Výběr vhodných genů, primerů a optimalizace PCR

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Barbora Somerová

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233148812

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Daniela Frynty PhD. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 2. června 2009

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli, Doc. RNDr. Danielu Fryntovi PhD., za všechny cenné rady, které mi poskytl a za pomoc při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kláře Palupčíkové za veškerou pomoc s laboratorní prací, trpělivý přístup při práci s použitým softwarem a za konzultace použitých metod.

Obsah

1. Cíl práce	5
2. Úvod	6
2.1. <i>Mauremys annamensis</i> jako v přírodě téměř vyhubený druh	6
2.2. Evoluce a fylogeneze čeledi Geoemydidae	6
2.3. Reprodukčně isolační mechanismy	9
2.4. Narušení RIM: Hybridizace	12
2.5. Důvody ohrožení	14
2.6. Problém komplexu <i>Mauremys annamensis</i> a <i>Mauremys mutica</i> a přehled dosavadních znalostí o genetice této skupiny	15
2.7. Metoda PCR a její uplatnění v praxi	21
3. Materiály a metody	24
3.1. Použité chemikálie	24
3.2. Použité přístroje	24
3.3. Použité metody	24
3.3.1. Výběr vhodného úseku pro amplifikaci	24
3.3.2. Výběr vhodné tkáně a odběr vzorků	25
3.3.3. Izolace DNA ze vzorků pomocí DNeasy Blood and Tissue Kit	25
3.3.4. Amplifikace vybraných segmentů DNA pomocí metody PCR	26
3.3.5. Orientační zjištění výsledků amplifikace PCR pomocí rozdělení na agarózovém gelu	27
4. Výsledky	28
5. Diskuze	32
6. Literatura	33
7. Příloha	39

1. Cíl práce

Mezi želvami v čeledi Geoemydidae je celkem běžná hybridizace, zejména mezi druhy žijícími v jihovýchodní Asii, jedná se o rody: *Mauremys*, *Cuora*, *Chinemys* a *Ocadia*. Proto se jak v zajetí, tak i ve volné přírodě běžně vyskytují hybridy těchto druhů.

V této práci bych chtěla na základě literárních pramenů vybrat a v laboratoři vyzkoušet a optimalizovat laboratorní molekulárně-biologické metody a postupy, které by posléze umožnily rutinní sekvenování vybraných mitochondriálních popřípadě i jaderných genů tak, aby bylo lze posléze geneticky charakterizovat všechny zakladatelské jedince zařazené do evropského programu záchraného chovu koordinovaného pražskou zoologickou zahradou. Tato práce má vytvořit předpoklady ke sběru sekvenčních dat, které by umožnily identifikovat pravděpodobný geografický původ zakladatelů chovu, jejich genetickou výlučnost a identifikovat zjevné mezidruhové hybridy, zejména prvních filiálních generací. Použité metody, tj. sekvenace omezeného počtu genů, ovšem nemohou aspirovat na detekci případné částečné introgrese genů jiných druhů do *M.annamensis*, k tomu by bylo třeba použít podstatně většího počtu jaderných markerů.

Cíle mé práce jsou:

- 1.1. Vybrat na základě předchozích studií prováděných na želvách čeledi Geoemydidae a příslušných dat v GENBANK vhodné geny, primery a postupy.
- 1.2. Vybrat pro odběr vhodné tkáně a izolovat z nich DNA.
- 1.3. Provést u několika jedinců pomocí metody PCR namnožení vybraného úseku DNA v kvalitě vhodné k sekvenaci.

2. Úvod

2.1. *Mauremys annamensis* jako v přírodě téměř vyhubený druh

Tento druh želv z jihovýchodní Asie se v posledních letech stal téměř vyhubeným. Neví se jistě, zda se tento druh ještě vyskytuje v přírodě, každopádně od roku 1939 byl pozorován ve volné přírodě pouze dvakrát.²⁷ Proto se dnes předpokládá, že volně tento druh již nežije. Několik jedinců existuje v zoologických zahradách a vzhledem k tomu, že se tomuto druhu daří v zajetí velmi dobře (želvy se v zajetí dobře množí, je vysoká líhivost vajec a velké procento mláďat dospěje do produktivního věku), je zde možnost navrácení tohoto druhu do přírody rozmnožením právě jedinců ze zoologických zahrad. K tomu je ale nezbytně nutné provést genetické vyšetření těchto jedinců a zjistit, zda se opravdu jedná o *M. annamensis*.

2.2. Evoluce Geoemydidae

Do čeledi Geoemydidae patří 73 druhů zařazených do 23 rodů. Je to největší čeleď želv na světě. Většinou se jedná o sladkovodní želvy (vodní a nebo obojživelné), které jsou rozšířené od Evropy a severní Afriky, do Indie a jižního Ruska, do Indonésie a Filipín. Kvůli tomu se jim občas přezdívá Old World pond turtles. V takzvaném novém světě – Americe se vyskytuje pouze jeden rod z této čeledi – *Rhinoclemmys*, který se osidluje oblast od Mexika, dále na jih v Ekvádoru, Venezuele a Brazílii.^{19,36,20,24}

Objevilo se několik prací zabývajících se evolucí a fylogenezí čeledi Geoemydidae, ve kterých byly použité různé metody. Z hlediska metod by mohly být tyto studie rozlišeny na morfologické, genetické a kombinované. Některé se zabývaly celým komplexem Geoemydidae, zatímco jiné byly pouze intragenerické.

První teorie o čeledi Geoemydidae byla od McDowell (1964) založená na 7 morfologických znacích. 23 druhů v této čeledi bylo rozděleno do čtyř rodových komplexů: *Batagur*, *Geoemyda*, *Hardella* a *Orlitia*.⁴⁵ Další teorie byla od Bramble (1974), vycházela z předchozí teorie, také obsahovala 23 rodů, ale tentokrát rozdělených do pěti rodových komplexů. Přibyl zde nový komplex *Heosemys*, do kterého byly zařazeny rody patřící dříve do komplexu *Geoemyda* (*Cyclemys*, *Cuora*, *Pyxidea* a *Heosemys*). Bramble rozlišil jednotlivé komplexy podle podobnosti uzavírání přední části krunýře.¹⁰ Birkham (1975) podpořil předchozí dvě teorie chromosomálními

daty.⁷ První fylogenetická studie s plně rozřešenými rodovými hladinami je od Hirayama (1984). Rozlišoval rody podle 82 morfologických znaků a čtyř chromosomálních dat. Podle nich rozdělil čeleď Geoemydidae na dvě větve: širokočelistnatou (*Batagur*, *Hardella*, *Orlitia*) a úzkočelistnatou (*Geoemyda*) větev.³³

Carr a Birkham (1986) rozdělili čeleď Geoemydidae na 6 rodových komplexů¹⁶, pět z nich bylo stejných jako u Bramble (1974), ale přidali další nový komplex na základě allozymových dat od Sites *et al.* (1984), která prokázala dostatečnou odlišnost rodu *Malayemys* na to, aby byl povýšen na samostatný rodový komplex.⁵⁸ Rod *Malayemys* byl u předchozích dvou teorií zařazen do komplexu *Batagur*.

Gaffney a Meylan (1988) podpořili Harayamovu teorii a jeho širokočelistnatou a úzkočelistnatou větev shledali na úrovni podčeledi a nazvali je *Batagurinae* a *Geoemydinae*.²⁹

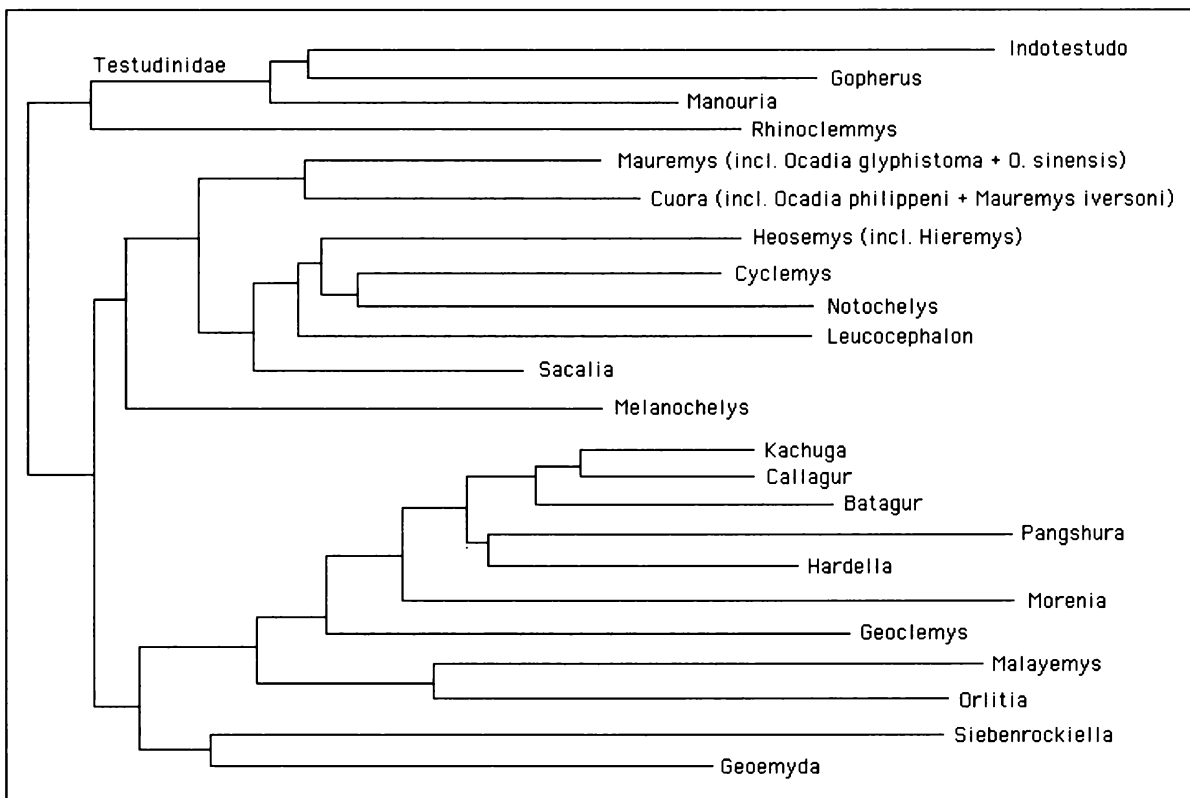
Yasukawa *et al.* (2001) je morfologická studie založená na analýze 35 morfologických znaků, obsahuje vzorky z 28 druhů podčeledi *Geoemydinae*.⁶⁵ Výsledky této studie se shodují s výsledky předchozí teorie od Hirayama (1984). Přišli na to, že rod *Rhinoclemys* není monofyletický. A rod *Cuora* rozdělili na *Cuora* a *Cistoclemmys*.

Honda *et al.* (2002) je studie, která zahrnuje vzorky 17 druhů z podčeledi *Geoemydinae* a čtyři druhy z podčeledi *Batagurinae*.³⁴ Analyzovali sekvence 882 bází dlouhého úseku mtDNA, genů 12S a 16S. Primárním cílem této studie byla fylogeneze v rodě *Cuora*. Vložili monotypický rod *Pyxidea* do rodu *Cuora*. Doporučili ztotožnit rody *Cistoclemmys* a *Pyxidea* s rodem *Cuora* (následovali to Stuart a Parham, 2004)⁶¹. Také poznamenali, že rod *Mauremys* se zdá být parafyletický s ohledem na *Chinemys* a *Ocadia*, ale nenapsali žádné taxonomické doporučení.

Nejkompletnější vzorky z dosavadních studií týkajících se celé čeledi Geoemydidae má studie od Spinks *et al.* (2004), kde použili 66 vzorků geoemydidů a pět vzorků testudinidů, díky tomu, pokryli celou čeleď Geoemydidae.⁵⁹ Jejich vzorky byly z 59 ze 73 druhů této čeledi a ze všech 23 rodů. Analyzovali tři geny, dva mitochondriální: cyt b a 12S a jeden jaderný: R35. Žádná jiná studie neobsahovala tak velké množství vzorků, ani tak dlouhou sekvenovanou genovou oblast. Proto lze studii Spinks *et al.* (2004) považovat za nejvíce přesnou genetickou teorii o fylogenezi čeledi Geoemydidae.

Podle výsledků ILD (Incongruence Length Difference) testu se nenašly rozdíly mezi mtDNA a nuDNA daty, nesoulad mezi mt a nu stromy by svědčil o hybridním původu jedince. Ale v mtDNA byly rozdílné výsledky pro cyt b a 12S. Tyto rozdíly byly na pozicích dvou rodů v čeledi Geoemydidae, tří rodů v čeledi Emydidae a dvou rodů v čeledi Testudinidae, ve kterých je i největší rozdíl v mtDNA. Také zjistili, že rody *Mauremys* a *Chinemys* tvoří monofylum a proto *Chinemys* zahrnují do rodu *Mauremys*.

Jako nejlepší výsledek označili kombinovaný fylogenetický strom sestavený podle ML (Maximum Likelihood), který je založen na datech získaných z analýz úseků DNA všech tří genů, tedy cyt b, 12S a R35 (viz obr. 1).



Obr.1: Fylogenetický strom z práce Spinkse *et al.* (2004) založený na ML analýze genů cyt b a 12S z mtDNA a rDNA a na analýze jednoho jaderného genu R35.

Byly publikovány i fylogenetické studie, které se zabývají pouze určitými taxonomickými skupinami, zpravidla na úrovni rodů (Sites *et al.*, 1984;⁵⁸ Iverson *et al.*, 1989;³⁵ Guicking *et al.*, 2002;³² Barth *et al.*, 2003;⁴ Barth *et al.*, 2004;⁵ Stuart a Parham, 2004⁶¹ aj.).

Za posledních 16 let bylo v Číně objeveno 13 nových druhů z čeledi Geoemydidae.⁴⁸ Minimálně u tří z nich byl prokázán hybridní původ, předmětem zkoumání ovšem bylo, zda se jedná o hybridy přírodní a nebo uměle vzniklé.

*Mauremys iversoni*⁵⁰ - jedná se o hybrida vzniklého křížením dvou druhů, *Mauremys mutica* a *Cuora trifasciata*. Tyto dva druhy jsou nejčastěji chovanými druhy na želvích farmách, *M. mutica* je běžně chovanou želvou pro maso a naopak *C. trifasciata* je běžně chovaná pro potřeby čínské tradiční medicíny. Tudíž se předpokládá, že ke křížení těchto dvou želvích druhů došlo právě na farmách, kde jsou tyto druhy nejčastějšími zástupci čeledi Geoemydidae. Navíc ve volné přírodě nebyla nalezena populace tohoto druhu.

*Cuora serrata*³⁵ - je hybrid dvou druhů, *Cuora galbinifrons* a *Cuora mouhotii*. *C. serrata* nikdy nebyla pozorována ve volné přírodě a nebo objevena na tržnicích, jedinci pocházely pouze z obchodu se zvířaty, proto se usuzuje, že se jedná o uměle vytvořeného hybrida.⁴⁸ Podle novější teorie je *C. serrata* výsledkem několikanásobného křížení mezi samci *C. mouhotii* a samicemi *C. galbinifrons* nebo *C. bourreti*.⁶¹

*Mauremys pritchardi*⁴⁴ - vznikl hybridizací mezi *Chinemys reevesii* a *Mauremys mutica*.⁶⁴ Zaznamenání jedinci pocházely pouze z obchodu se zvířaty.

2.3. Reprodukčně izolační mechanismy

V Asii se vyskytuje velké množství želvích farem, kde jsou želvy chovány a množeny pro maso. Dochází k mezidruhové hybridizaci, může k tomu docházet buďto zcela záměrně za účelem získání želvy morfologicky odlišné od ostatních druhů, kterou se pak farmáři pokusí prodat zpravidla americkým vědcům, kteří jsou ochotni za nový druh želvy náležitě zaplatit. Ovšem na těchto farmách dochází i k náhodnému křížení druhů a vzniká zde velké množství hybridů.⁵⁴

Ke stejnému mezidruhovému křížení může docházet i v přírodě, ovšem zde není tak běžné, protože existuje řada reprodukčně izolačních mechanismů (dále jen RIM), které zabraňují tomu, aby docházelo k mezidruhovému křížení a tedy i genovému toku.⁸ Existují dva typy RIM.

1) Vnější RIM – Tyto mechanismy existují v prostředí nezávisle na existenci a biologických vlastnostech organismů.²³

- **Geografická izolace** – Geografická vzdálenost může působit jako izolační bariéra tím, že zabraňuje setkání dvou izolovaných druhů a tudíž i jejich potenciální mezidruhové hybridizaci. Bez izolační bariéry ovšem k hybridizaci může docházet, ale nemusí.⁵² Záleží to na tom, zda si geograficky izolované druhy zachovaly ještě schopnost potencionální hybridizace, zda se ještě vzájemně nediferencovali dostatečně. Populace původního druhu geograficky oddělená se může odděleně vyvíjet a v jejím genofondu se budou postupně hromadit mutace, které povedou k fenotypovému a poté i ekologickému rozrůznění populací a k allopatrické speciaci.²³

- **Časově izolační mechanismy** – Druhy se mohou vyskytovat v rozdílném ročním období, mohou mít rozdílné období páření, tím nemůže dojít k jejich vzájemné hybridizaci.⁵² K časové izolaci také dochází u druhů, které mají několikaleté životní cykly.²³

2) Vnitřní RIM – Jsou to mechanismy přímo a nebo nepřímo určeny genotypem organismů a vznikají či zanikají důsledku genetických procesů, například v důsledku mutací, případně rekombinací. Jsou rozděleny na dvě skupiny podle toho, kdy se uplatňují, zda před a nebo po splynutí gamet.⁸

a) Prezygotické RIM

Mezi prezygotické RIM patří jakékoli faktory, které snižují pravděpodobnost vzniku hybridních zygot.

- **Prostorová izolace** - Některé druhy mohou žít ve stejné geografické oblasti, ovšem v rozdílných biotopech a nebo mohou žít ve stejné geografické oblasti, i stejném biotopu, ale využívají například jiné živné rostliny, proto se budou tyto druhy méně potkávat a je tedy i menší pravděpodobnost, že se mezi sebou spáří.²³

- **Časová izolace** – Vyskytuje se mezi dvěma druhy, žijícím na stejném území, které jsou ale aktivní v jinou denní dobu, proto se nemusí mezi sebou vůbec potkávat.⁵²

- **Morfologická izolace** - Mezi tyto faktory patří morfologická odlišnost kopulačních orgánů, která se vyskytuje zejména u více vzdálených druhů a která zabraňuje vlastní kopulaci. Tyto odlišnosti se vyskytují u rostlin opylovaných hmyzem⁸ nebo třeba u členovců.²³

- **Vnější gametický nesoulad** – Tento izolační mechanismus existuje pouze u druhů s vnějším oplodněním, kteří vypouští svoje gamety z těla a k oplodnění dochází mimo tělo samice. Při setkání gamet jiných druhů nemusí působit vzájemná chemoatrakce a tudíž je i pravděpodobnost oplodnění u mezidruhové hybridizace nižší.⁵²

- **Vnitřní gametický nesoulad** – Po úspěšné kopulaci nedojde k oplodnění vajíčka. Může se tak stát z několika důvodů, například tělo samice zničí spermie cizího druhu, spermie nebudou schopny najít vajíčko a nebo prorazit jeho membránu.

- **Izolační mechanismy etologické** – Tento nesoulad existuje pouze u živočichů. Kterí mají určité namlouvací a pářící rituály, které jsou druhově odlišné. Může se jednat o podněty zvukové (různé typy zvukového vábení, např. u žab), chemické (produkce feromonů), světelné (u světlušek) a pohybové (u hmyzu tvorba rojů).⁵² Etologické izolační mechanismy se uplatňují až tehdy, když se jedinci odlišných druhů setkají. Z energetického hlediska jsou velice výhodné, jedinci neplýtvají energií na páření a neefektivní produkci potomstva.⁸

b) Postzygotické RIM

Patří sem mechanismy, které se uplatňují až po oplození vajíčka mikrogametou cizího druhu. Nevýhodou těchto izolačních mechanismů je, že snižují biologickou zdatnost daného jedince.²³

- **Zygotická mortalita** – Sice dojde k úspěšnému oplodnění vajíčka a vznikne hybridní zygota, ale ta se dále nevyvíjí a odumře.⁴⁶

- **Embryonální až juvenilní mortalita** – V jakékoli fázi embryonálního a postembryonálního vývoje se může projevit narušení funkcí a vývoje rozrůznění, které vede ke smrti hybridního organismu.⁵²

- **Neživotaschopnost F1** – Vývoj hybridního jedince je ukončen úspěšně, ale hybrid není vybaven pro život a není přizpůsoben k životu v ani jedné z ekologických oblastí, v kterých žijí rodiče.²³

- **Sterilita F1** – Vývoj hybridního potomka byl úspěšně dokončen, má i dobrou fitness, ale není schopen se rozmnožovat. V případě hybridů nebo jejich potomků v přírodě je sterilita mnohem častější než jejich neživotaschopnost.³⁹

- **Sexuální výběr** – Hybridní potomci nejsou tak úspěšnými kandidáty při výběru partnerů na spáření.⁴⁶

- *Mortalita, neživotaschopnost či sterilita hybridů v F2* – První generace hybridních potomků je plně vyvinuta a životaschopná, RIM se uplatní až v druhé generaci.⁵²

Tyto izolační mechanismy platí obecně u rostlin a živočichů. U želv jsou určité výjimky. Například u sterility F1 se uplatňuje u většiny živočichů Haldanovo pravidlo.

Haldanovo pravidlo - Sterilita mláďat postihuje vždy heterogametické pohlaví, u savců je to samec nesoucí chromozomy XY.⁶

U želv ale toto pravidlo neplatí, stejně jako u všech ostatních živočichů, jejichž pohlaví je určeno teplotně a tudíž nemají pohlavní chromozomy a nemůžeme u nich rozlišit heterogametické a homogametické pohlaví. Proto je také pravděpodobné, že se v těchto taxonomických skupinách bude rodit více fertálních mláďat než v ostatních.

Obecně v čeledi Geoemydidae se zdá, že jsou izolační mechanismy celkem slabé, v roce 2005 bylo zdokumentováno 19 případů hybridizace a to i mezi fylogeneticky vzdálenými jedinci této čeledi.¹⁵ Proto lze i u druhů *M. mutica* a *M. annamensis* předpokládat, že nejsou téměř žádné RIM vzhledem k tomu, že jsou to velmi příbuzné druhy. V literatuře nejsou žádné známé důkazy o uplatňování prezygotických RIM u volně žijících jedinců. Části jejich populací obývají stejnou geografickou oblast i stejné biotopy. A z etologického hlediska jsou si oba druhy také velmi podobné. Samice se zpravidla spáří se samcem, který je dobře viditelný, což bývá způsobeno zpravidla světlými pruhy. Ani o uplatňování postzygotických RIM u těchto druhů neexistuje v literatuře žádný zdokumentovaný případ, z toho lze usuzovat, že jsou si tyto druhy podobné i z fyziologického hlediska. Proto je zde možný výskyt hybridních jedinců.

2.4. Narušení RIM: Hybridizace

Dříve se předpokládalo, že zvířata hybridizují jen velmi zřídka v přírodě, proto se ani neuvažovalo, že by byla přirozená hybridizace důležitá v evoluci zvířat.¹³ Ale později se došlo k výsledkům, že zvířata hybridizují mnohem častěji, než se předpokládalo a že to může vést k introgressi. Introgrese je pohyb genů mezi druhy zprostředkovaný zpětným křížením.²

K hybridizaci dochází při porušení izolačních mechanismů za přispění lidské přítomnosti.⁴³ Proto se předpokládalo, že k hybridizaci pravděpodobněji dojde u druhů

allopatrických, kde původní populace byla oddělena, geograficky izolována a vznikly nové druhy.³¹ Pokud budou tyto druhy uvedeny do kontaktu, mohli by spolu hybridizovat. U sympatrických druhů, které se vyvinuly z původní populace bez předchozí geografické izolace, se očekávalo, že si vyvinuly izolační mechanismy proti hybridizaci, ale mnoho studií ukazuje, že hybridy jsou i mezi sympatrickými druhy.⁴²

Historicky bylo obtížné detekovat zvířecí hybridy, obvykle měli pár morfologických odlišností od jednoho z rodičů a nebo morfologické znaky mnoha druhů.⁶ Rozpoznávání hybridů se zjednodušilo a zpřesnilo s vývojem a používáním molekulárních technik.¹²

1) Nemolekulární metody rozpoznávání hybridů – používaly se zejména dříve před objevením molekulárních technik, ale některé z těchto metod jsou dodnes používány.⁴¹ Studie používající tyto metody určovaly hybridy podle morfologických znaků, nebo jiných vlastností jako třeba vydávaných zvuků, cytotypů a nebo feromonů. U želv se běžně používala a dodnes používá metoda určování podle morfologických znaků. Želvám se měří délka krunýře a jeho šířka v různé délce, velikosti štítků na plastronu, zjišťuje se barva karapaxu a plastronu a vzory na nich.

- *M. mutica* má hladký karapax a plastron je označen několika středně velkými skvrnami, má jeden světle žlutý pruh na krku, který se nesahá dál než k očím.²⁷
- *M. annamensis* má černý karapax, plastron je označený mnoha černými skvrnami a má dva až tři žluté pruhy na krku, které se nachází i na hlavě a setkávají se na špičce nosu.²⁷

Tyto metody mají ale i své nevýhody, které je limitují. Hybridy mají znaky, které jsou vzhledově mezi znaky dvou druhů, ovšem v rámci některých taxonů mohou být jedinci vzhledově různorodí a proto může být obtížné určit, zda se jedná o hybrida a nebo jen o vzhledově odlišného jedince.⁶ A samozřejmě je nemožné pomocí těchto metod určit, zda se jedná o F1 hybrida a nebo o hybridního jedince, který dostal hybridní geny od svých jiných předchůdců než od rodičů.

2) Molekulární metody rozpoznávání hybridů – v šedesátých letech byla objevena allozymová analýza. Je to elektroforetická metoda, využívající prostupnost DNA, na základě různého molekulového uspořádání, náboje či přesné nukleotidové sekvence. Tato metoda je užívaná v mnoha studiích (Parham *et al.*, 2001;³⁰ Georges *et al.*, 2001⁴⁸). V roce 1985 byla objevena metoda polymerase chain reaction (dále jen PCR), která

znamenała revoluci v evoluční biologii. Dnes existuje velké množství obměn a různých vylepšení této metody, při určování hybridů se běžně používá technika mikrosatelitů (použitá například ve studii Burns *et al.*, 2003)¹⁴ a nebo ISSR-PCR (ve studii Schilde *et al.*, 2004)⁵⁶. Při těchto metodách se amplifikuje nejen úsek mtDNA, ale i jaderné DNA. Protože mtDNA je děděna výhradně po matce, nedostali bychom analýzou mitochondriálních genů žádné informace o případné hybridizaci se samcem jiného druhu.

V dnešní době se ve většině studií používá přímé sekvenace PCR produktů než elektroforetických metod (požití PCR ve studiích: Parham *et al.*, 2001;³⁰ Barber *et al.*, 2003;³ Barth *et al.*, 2003;⁴ Burns *et al.*, 2003;¹⁴ Spinks *et al.*, 2004;⁵⁹ Fritz *et al.*, 2005;²⁵ Spinks a Shaffer, 2007)⁶⁰. Tato metoda poskytuje mnoho údajů, které není možné zjistit pomocí morfologických metod. Ve většině studií se používá sekvenace mitochondriálních genů, protože se s nimi lépe manipuluje a jsou početné.⁵⁷ Problém je, že mitochondriální DNA je materlineárního původu a tudíž se nezúčastnila procesu rekombinace a slouží tedy jen k účelu určování druhu matek jedince. K tomu, abychom byli schopni určit stupeň hybridizace nebo introgrese je nutné provést sekvenci i nukleárního genu, obzvláště nekódující oblasti introny jsou bohaté na mutace, které se v nich hromadí rychleji, než v kódující oblastech exony.^{28,47}

Mezidruhovú hybridizace také ovlivnila vývoj zvířecích druhů, ovšem je velmi diskutabilní, do jaké míry ho ovlivnila.¹⁸ Mnoho druhů má pravděpodobně hybridní původ. Díky hybridizaci vznikají nové kombinace genů a alel, které mohou vést k větší adaptibilitě a diversifikaci. V případě, kdy jsou oba rodiče dokonale přizpůsobeni prostředí ve kterém žijí a setkají se v tzv. hybridní zóně, kde hybridizují, se může stát, že hybrid bude mít znaky někde mezi znaky svých rodičů a nebude tudíž tak dobře přizpůsoben ani do jednoho z těchto prostředí. Ale právě díky tomuto se stane více univerzálním a schopným osídlit vhodné oblasti, změna přirozeného prostředí mu může přinést výhody, jaké ostatní druhy nemají.⁶ A to může vést k evoluci nového druhu.¹¹

2.5. Důvody ohrožení

Téměř všechny druhy asijských želv čelí v dnešní době vyhynutí. Je to způsobeno mnoha důvody, ale nejzávažnější je nejspíš čínský trh s želvím masem a poptávka čínské tradiční medicíny. Dokonce se objevily i názory, že potřeby čínského trhu jsou

prvotní příčinou vyhubení želví populace v Asii.⁶³ V zemích jižní a jihovýchodní Asie jsou želvy loveny ve svých přirozených prostředích a jsou exportovány přes Hong Kong do Čínské Lidové Republiky, kde se prodávají většinou nelegálně na čínských tržnicích (*M. annamensis* byla dříve čas od času nalezena na tržnicích, ale poslední roky už ne). Hlavními exportními zeměmi jsou Myanmar, Malajsie, Indonésie (hlavně Sumatra) a Vietnam.¹ Cena jedné želvy na tomto trhu může dosahovat až několika tisíc amerických dolarů, odvíjí se zpravidla od vzácnosti výskytu daného druhu.⁵³ Z tohoto důvodu je povolání lovce želv velmi lukrativní a mnoho drobných zemědělců a chudších lidí se jím dobrovolně stává. Lovná sezóna je v době páření tedy od dubna do září.²¹

Dalšími faktory, díky kterým se želví populace v Asii zmenšuje je třeba osídlování a odvodňování oblastí pro zemědělské nebo hospodářské účely, které provázejí nedávnou ekonomickou reformu v Číně.⁴⁸ Tímto procesem přicházejí želvy o své přirozené prostředí a svoje kladiště. Problémem je též časté užívání chemických hnojiv a pesticidů v zemědělství a jejich hromadění v půdě, což způsobuje kontaminaci prostředí, která má škodlivý vliv na želví populaci.

12 z 16 nejvíce ohrožených druhů želv patří do čeledi Geoemydidae. A jeden druh z této čeledi je dokonce považován za vyhynulý – *Cuora yunnanensis*.

2.6. Problém komplexu *Mauremys annamensis* a *Mauremys mutica* a přehled dosavadních znalostí o genetice této skupiny

Řád: Testudines

Čeleď: Geoemydidae

Rod: *Mauremys*

Do tohoto rodu patří sladkovodní želvy, které obývají poměrně rozsáhlé oblasti od severozápadní Afriky, jižní Evropy a Středního Východu dále na východ až po Japonsko. Dorůstají poměrně malé velikosti, délka jejich krunýře se pohybuje v rozmezí od 18 do 25 cm.

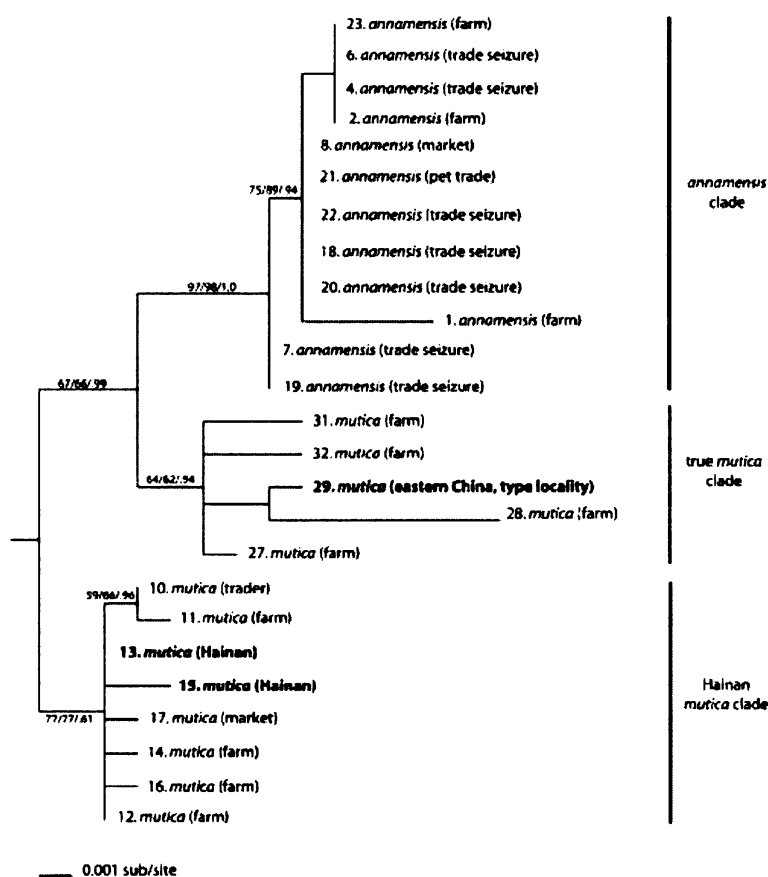
V rámci čeledi Geoemydidae existuje monofyletická skupina, do níž patří tři rody: *Mauremys*, *Chinemys* a *Ocadia*. Z nichž rod *Mauremys* je parafyletický. V této skupině jsou 4 genetické linie (rozdělení podle studie Barth *et al.*, 2004)⁵:

- 1) *Mauremys japonica* + *Chinemys* + *Ocadia*
- 2) *Mauremys annamensis* + *Mauremys mutica*

3) *Mauremys caspica* + *Mauremys rivulata*

4) *Mauremys leprosa*

Už z tohoto rozdělení je patrná blízká genetická příbuznost mezi *M. annamensis* a *M. mutica*, tato příbuznost byla předpokládána v několika studiích (Iverson a McCord, 1994;³⁸ Yasukawa *et al.*, 2001)⁶⁵ a později i potvrzena studií od Barth *et al.* (2004)⁵. Dalším předpokladem bylo, že druh *M. mutica* je ve vztahu k *M. annamensis* parafyletický, což potvrdila studie Feldman a Parham (2004)²². Zjistili rozdíly v příbuznosti mezi *M. annamensis* a *M. mutica* z Číny a z Vietnamu (Hainanské provincie). Přišli s teorií, že Vietnamská *M. mutica* je hybridním mládětem samce čínské *M. mutica* a samice *M. annamensis*, kvůli malému rozdílu v mtDNA.

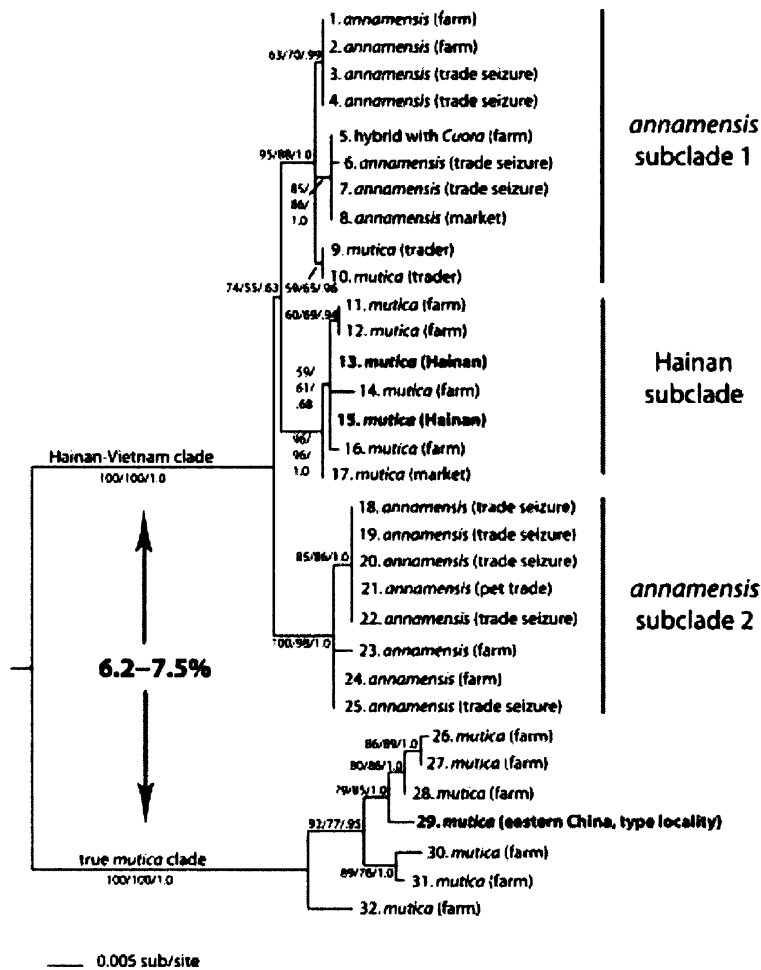


Obr. 2: Fylogram zobrazující výsledky ML analýzy R35 jaderného intronu

Tuto teorii dále rozpracovali Fong *et al.* (2007)²⁷, kteří vysvětlili genetickou odlišnost a hlavní genetické skupiny uvnitř *mutica* komplexu, zjistili velký mitochondriální rozdíl mezi dvěma *mutica* větvemi (čínská-pravá *mutica* a

vietnamská). Podle mt a nuDNA stromů je *M. annamensis* vložena do *mutica* komplexu. Podle mtDNA stromu je *M. annamensis* blíže příbuzná vietnamské *M. mutica*, zatímco podle nuDNA stromu je více příbuzná čínské *M. mutica* (viz obr. 2 a 3).

Rozdíly v topologii mohou být způsobeny biologickými faktory (introgrese, přetrvávání polymorfismu předků) nebo lidskými faktory (přesídlování, umělá hybridizace). Fong *et al.* (2007)²⁷ také předpokládají, že *M. annamensis* může mít větší rozsah, než se doposud zjistilo. Tento předpoklad zakládají na genetické odlišnosti v rámci tohoto druhu, analýza mtDNA je přivedla ke dvěma mitochondriálním podvětvím. Což nastolilo otázku, zda i v rámci komplexu *annamensis* jsou genetické skupiny tak jako v komplexu *mutica*.



Obr. 3: Fylogenetický strom podle Fong *et al.* (2007)²⁷, ukazující výsledky ML analýzy mitochondriální DNA

Mauremys annamensis

Tato želva také bývá občas označovaná jako želva annámská, v angličtině používaný obecný název leaf turtle a nebo *annamemys annamensis*, i když toto označení se používalo spíše dříve, než byla tato želva správně taxonomicky zařazena do rodu *Mauremys* (dříve byla tato želva chybně zařazena do rodu *cyclemys*). Jde o poměrně nedávno objevený a identifikovaný druh, poslední objevený druh z rodu *Mauremys*.

Výskyt *Mauremys annamensis* je znám pouze v centrálním Vietnamu, ale i zde byla naposledy pozorována od roku 1939 pouze dvakrát.²⁷ Díky své omezené distribuci dnes patří mezi jeden z nejohroženějších druhů na světě.



Obr. 4: *Mauremys annamensis*

Prostředím výskytu tohoto druhu jsou zejména jezera, rybníky, močály, slepá ramena řek a mokřady, kde je dostatek husté vegetace, ve které se mohou schovávat před svými predátory a kde se zároveň vyskytuje dostatek potravy. Ve volné přírodě jsou tyto žely prakticky všežravé, živý se drobnými živočichy, šneky, zbytky zvířat, ale i rostlinami a spadlým ovocem.

Barva jejího karapaxu je tmavě hnědá, místy přechází až do černého odstínu. Na karapaxu se nevyskytují nápadné barvy. Oproti tomu má plastron poměrně výrazné zbarvení v odstínech oranžově-žluté s černými skvrnami na každém štítku, které tvoří

dva laterální pruhy po celé délce plastronu. Celkový tvar krunýře je zploštělý a protáhlý. Nejvýraznějším znakem této želvy jsou bezesporu její tři světle žluté pruhy. První z nich má tvar V, začíná na vrchu hlavy a pokračuje přes spánky po celém krku. Druhý z nich je širší a jasnější, začíná u nosních dírek a odtud pokračuje po celé délce krku. Poslední z nich začíná zhruba uprostřed horní čelisti a rovněž pokračuje po celém krku. Spodek hlavy i krku má žlutou barvu. Jejich oči mají žlutou barvu a uprostřed jsou přetnuty vodorovnou černou linkou.

Vyskytuje se zde pohlavní dimorfismus, samci mají delší a širší ocas než samice. Dodnes se ví velice málo o pářících zvycích tohoto druhu.

Tento druh je na listu Turtle Conservation Fund jako ohrožený. Také je zařazen do Apendixu II na seznamu The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna (dále jen CITES).⁹

Mauremys mutica

Toto je další zástupce rodu *Mauremys*, jemuž se také říká yellow pond turtle, vyskytuje se v širokém pobřežním pásmu ve střední a jižní Číně, v severním Vietnamu, jižním Laosu a Thajsku. Kromě tohoto pásma obývá též jeden z japonských ostrovů, ostrov Yaeyama.



Obr. 5: *Mauremys mutica*

Přirozeným prostředím jsou zátoky, bažiny většiny vodních cest, mokřady a zatopená pole. Ve volné přírodě jsou všežravci, živí se prakticky všemi drobnějšími

živočichy, které najdou ve vodě, ale také i řasami, trávou, vodními rostlinami a spadlým ovocem.

Délka krunýře samic dorůstá do maximální délky 17 cm. Krunýř má podlouhlý oválný tvar a je zploštělý, jeho zvláštností u tohoto druhu je, že je širší vzadu než ve předu. Převládající barva na krunýři je hnědá až černá, barva karapaxu je velmi různorodá a zpravidla se liší u jednotlivých poddruhů. Plastron je oranžově-žlutý s černými skvrnami podél okrajů každého štítku. Karapax a plastron jsou spojeny mostem, který má stejnou barvu jako plastron a na každé straně krunýře je označen dvěma černými skvrnami. Hlava je středně velká v barvě od šedé po hnědočernou. Tento druh má typicky krátký nos, jakoby zploštělý, podle kterého dostal své jméno – *mutica*. I *Mauremys mutica* má širší světle žlutý pruh, táhnoucí se od začátku krku až k očím po obou stranách, ale na rozdíl od *mauremys annamemys* končí tyto dva pruhy u očí a nesetkávají se na nose. Spodní část hlavy a krku a dolní okraj horní čelisti má světle žlutý. Má velké a hnědé oči. Končetiny mají šedou až olivovou barvu seshora a žlutavou zespoda.

U *M. mutica* se vyskytuje stejný pohlavní dimorfismus jako u *M. annamensis* – samci mají delší a tlustší ocas. Samice bývají pohlavně dospělé okolo šestého roku života. K páření dochází v březnu a nebo dubnu a později v červnu a nebo v červenci kladou samice vajíčka do hnízd, která si vyhrabávají na vodních březích. Maximálně kladou osm vajec, která jsou oválná a středně velká. Podle teplotních podmínek se odvíjí délka inkubační doby, která je od 64 do 96 dní.

Díky širokému rozšíření tohoto druhu se u něj vyskytuje dva poddruhy, které se od sebe vzájemně liší podle toho, v jakém prostředí žijí.

M. m. mutica – hlavní rasa, jsou ocelově šedý, mají téměř celý černý karapax a plastron.

M. m. kami – světle hnědý karapax, menší černé skvrny na plastronu, neobvyklý pohlavní dimorfismus (samci jsou větší než samice)

Ačkoliv je tento druh široce rozšířen, v přírodě neustále ubývá jeho jedinců a pravděpodobně se velmi brzy stane vzácným.⁹

2.7. Metoda PCR a její uplatnění v praxi

Metoda PCR (Polymerase chain reaction) byla vyvinuta Karym B. Mullisem v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii. Kary B. Mullis byl za tento objev v roce 1993 oceněn Nobelovou cenou za chemii.

PCR je enzymatická amplifikace DNA in vitro syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních cyklech.

V prvním cyklu při optimální teplotě 95 °C je nejprve dvouvláknová molekula DNA rozpletena na jednotlivé templátové molekuly DNA, které slouží jako matrice pro amplifikaci DNA. Nemusí být známa celá nukleotidová sekvence cílového úseku, ale musí být známé krátké sekvence na obou koncích úseku. K tomu, aby bylo možné amplifikovat vybraný úsek, je nutné ho označit a to na obou stranách. Proto se používají krátké oligonukleotidové sekvence DNA – primery. Primery jsou komplementární ke krátkým úsekům DNA na obou koncích cílového úseku, jsou zhruba 20 až 30 bází dlouhé a nesmí by být mezi sebou komplementární, aby nedošlo k navázání primerů na sebe. Primery se naváží na oba konce vybraného úseku DNA a syntéza nových vláken začíná od nich. Tato syntéza je katalyzována termostabilní DNA polymerázou, probíhá vždy od 5' ke 3' konci. Během prvního cyklu jsou syntetizovány delší úseky, protože syntéza probíhá až za cílovou oblast DNA. V dalších cyklech probíhá syntéza převážně cílové oblasti označené primery. Asi nejčastěji používanou termostabilní polymerázou je *Taq* z bakterie *Thermus aquaticus*, dalšími používanými jsou *Tfi*, *Tbr* a *Tth*, všechny s 5'→3' exonukleasovou aktivitou.

Při PCR se obvykle objem reakční směsi pohybuje v rozmezí od 20 do 100 µl. Při přípravě reakční směsi se postupně do ependorfekt pipetuje ddH₂O, PCR pufr (obsahuje Tris-HCl, KCl, popřípadě acetamid, albumin, želatinu a nebo Tween-20), hořečnaté kationy, deoxynukleotidtrifosfáty dNTP, primery, polymeráza a nakonec vzorek izolované DNA.

Teplotní fáze reakčního cyklu:

1. fáze – denaturace DNA, optimální teplota 95°C
2. fáze – nasedání primerů, obvykle teplota mezi 50°C až 55°C
3. fáze – syntéza DNA, teplota mezi 70°C až 74

Před prvním reakčním cyklem probíhá delší denaturace, která trvá řádově několik minut. Počet cyklů se obvykle pohybuje mezi 15 až 30 cykly, ale je možné opakovat cyklus i vícekrát. Při posledním cyklu je reakce ukončena a teplota klesne na 10°C.⁵¹

Tab. 1: Zobrazuje studie týkající se rodů čeledi Geoemydidae, ve kterých byla použita metoda PCR:

Studie	Sledované rody	Použité markery	Délka úseků
Stuart a Parham, 2007	Ocadia, Serrata	R35	1156 bp
Feldman a Parham, 2004	Mauremys, Cuora	COI + ND4, tRNA-Thr,His,Leu	700 + 900 bp
Stuart a Parham, 2004	Cuora	COI + ND4, tRNA	897 + 892 bp
Prashag <i>et al.</i> , 2007	Batagur, Callagur, Hardella, Kachuga, Pangshura	cyt b, tRNA-Thr	cca 300 bp
Spinks a Shaffer, 2007	Cuora	COI, cyt b, ND1, ND2, ND4, CR, 12S	cca 15,8 kbp
Diesmos <i>et al.</i> , 2005	Heosemys	cyt b + R35	1174 + 1076 bp
Shi <i>et al.</i> , 2005	Cuora	ND4, tRNA	841 bp
Buskirk <i>et al.</i> , 2005	Mauremys, Sacalia	COI + ND4, tRNA	700 + 900 bp
Barth <i>et al.</i> , 2004	Mauremys	cyt b, tRNA-Thr	1080 bp
Fritz <i>et al.</i> , 2006	Mauremys	cyt b, tRNA-Thr + Cmos	cca 300 + 600 bp
Le <i>et al.</i> , 2007	Kachuga	12S, 16S, cyt b, Cmos, Rag1, Rag2	4015 bp
Fritz <i>et al.</i> , 2005	Mauremys	cyt b	1100 bp
Honda <i>et al.</i> , 2002	Cuora, Pyxidea, Cistoclemmys	12S, 16S	882 bp
Parham <i>et al.</i> , 2001	Cuora	COI + ND4, tRNA-Thr,His,Leu	700 + 900 bp
Fong <i>et al.</i> , 2007	Mauremys	R35 + ND4, tRNA-Thr,His,Leu	1133 + 892 bp
Schilde <i>et al.</i> , 2004	Cyclemys, Ocadia	cyt b	1036 bp
Spinks <i>et al.</i> , 2004	celá čeleď Geoemydidae	cyt b + R35 + 12S	1140 + 712 + 400 bp

Pomocí metody PCR lze amplifikovat vybrané oblasti DNA, které mohou být posléze použity k analýze genetické příbuznosti a fylogeneze živočišných druhů. Geny se zpravidla volí podle toho o jaký typ studie se jedná. Pokud se jedná o intagenerickou studii, upřednostňuje se analýza tzv. rychlejších genů, ve kterých se rychleji hromadí mutace. U studií týkajících se většího genetického komplexu se používají geny pomalejší. V rámci čeledi Geoemydidae byla tato metoda celkem hojně používána, v tabulce 1 se nachází přehled o tom, jaké geny u jakých rodů byly namnoženy.

V poslední době se objevily nové typy PCR, které se začaly používat i ve studiích týkajících se čeledi Geoemydidae:

Real-time PCR je založená na klasické PCR, ale narušila od ní je možné monitorovat přírůstky během každého cyklu, kdežto u klasické PCR se detekuje až finální produkt. Toto monitorování je umožněno díky fluorescenční sondě, která obsahuje oligonukleotidový řetězec, díky němuž se váže na nasynthetizovanou DNA. Na oligonukleotidovém řetězci jsou vázány fluorescenční barvivo a zhášec. Čím je větší vzdálenost mezi nimi, tím je větší fluorescence. Tedy úroveň fluorescence odráží nasynthetizovanou DNA. Tato metoda se provádí na termocyklerech, které obsahují optiku umožňující excitaci substrátů a následnou detekci fluorescence. Fluorescenční značení bylo použito například v Barber *et al.* (2003).³

ISSR-PCR je metoda při které se amplifikuje úsek DNA ležící mezi dvěma stejnými mikrosatelitními sekvencemi, které jsou umístěny v řetězci DNA v opačných směrech. Mikrosatelity jsou krátké opakující se sekvence několika nuklotidů (1-4) nacházející se v celém genomu, které se liší počtem opakování. Mikrosatelity se vyskytují pouze u eukaryot. Při této metodě se používají mikrosatelitní primery. Byla použita například ve studiích Fritz *et al.* (2005)²⁵, Schilde *et al.* (2004)⁵⁶ nebo Burns *et al.* (2003)¹⁴.

3. Materiály a metody

3.1. Použité chemikálie

Ke skladování DNA vzorků byl použit 96% EtOH. Pro izolaci DNA ze vzorků byl použit DNeasy Blood and Tissue Kit, který obsahuje Buffer ALT, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE, proteinasa K, vše od výrobce Qiagen.

Při metodě PCR byly k amplifikaci DNA použity primery L-ND4 a H-Leu od firmy Generi-biotech, 5 U/ml Taq polymeráza, ddH₂O, 10mM roztoky deoxyribonukleotidů, 50mM roztok MgCl₂ a Buffer na PCR vše od firmy Fermentas.

Při gelové elektroforéze byly použity následující chemikálie agaróza, TBE pufr, ethidiumbromid, délkový standard GeneRuler™ 100bp DNA Ladder a Barvivo Loading Dye objednané od firem Serva, Sigma a Fermentas.

3.2. Použité přístroje

Termocykler: TC-312 (TECHNE)

Centrifuga: minispin (Eppendorf)

Vortex: minishaker MC2 (Kika)

3.3. Použité metody

3.3.1. Výběr vhodného úseku pro amplifikaci

Metodu PCR jsem se rozhodla vyzkoušet u jednoho mitochondriálního genu. Doposud se v publikacích objevily amplifikace celých genů a nebo jejich částí. Jako mitochondriální molekulární markery byly použity tyto úseky:

COI (cytochrom c oxidázová podjednotka I)

ND1 (nikotinamidadeninukleotid dehydrogenázová podjednotka 1)

ND4 (nikotinamidadeninukleotid dehydrogenázová podjednotka 4)

cyt b (cytochrom b)

(Seznam publikací a použitých markerů v tabulce 1 v kapitole 2.7.)

Patrně nejčastěji používaným mitochondriálním markerem, se stal právě cyt b, který se běžně používá nejen u čeledi Geoemydidae. U rodu *Mauremys* byly nejčastěji izolovány dva mitochondriální markery a to sice cyt b a ND4. Z těchto dvou oblastí

jsem si vybrala ND4, vzhledem k tomu, že již bylo provedeno úspěšné amplifikování tohoto genu přímo na družích *M. annamensis* a *M. mutica* ve studii od Fong *et al.* (2007)²⁷.

Rozhodla jsem se použít i stejné primery jako v této studii:

L-ND4: 5'-GTAGAAGCCCCAATCGCAG-3'

H-Leu: 5'-ATTACTTTTACTTGGATTTGCACCA-3'

Pomocí těchto primerů se amplifikuje úsek DNA dlouhý 892 bází, v němž jsou obsaženy sekvence pro celé geny ND4, tRNA-His, tRNA-Ser a část genu tRNA-Leu.

3.3.2. Výběr vhodné tkáně a odběr vzorků

Existuje několik možností, z čeho lze izolovat DNA. Je možné izolovat DNA z tkání orgánů nebo ze svaloviny, ovšem je to dost invazivní zákrok pro zvíře a proto se tato metoda izolace používá zejména u muzejních exponátů a nebo uhynulých zvířat.

Asi nejjednodušším způsobem je izolace z krve. U želv se odebírá krev injekčně z kostrční artérie na ocasu. Ovšem tento odběr vyžaduje vhodné podmínky, značnou zručnost a zkušenost s tímto druhem odběru, navíc zvíře nesmí být stresované. Pokud je zvíře stresované a cítí se ohroženo, stáhnou se mu cévy. V tomto případě je u želv, jakožto u chladnokrevných živočichů, odběr krve téměř nemožný. Proto bývá poněkud obtížné získat dostatečné množství vzorku krve.

Další možností je izolace DNA ze slin. Sliny se odebírají bukáními stěry ústní dutiny. Tato metoda je ovšem u želv téměř nepoužitelná vzhledem k tomu, že želvy dokáží zatáhnout svoji hlavu do krunýře, v případě že se cítí ohroženy.

Izolaci DNA lze provést z krycích tkání, jako je kůže, šupiny nebo i drápy. U želv jsem zvolila izolaci DNA z odstřižených drápků. Jejich odběr není invazivní a zvíře není příliš stresováno. navíc je odběr snadný a účinný.

Vzorky se dávají do sterilních ependorfek naplněných 96% EtOH, pokud se jedná o krev, je objem EtOH 2/3 a objem krve 1/3 z celkového objemu ependorfky, nejčastěji používaný objem je 1,5 ml. Ependorfky se vzorky se skladují v lednici.

3.3.3. Izolace DNA ze vzorků pomocí DNeasy Blood and Tissue Kit

K izolaci jsem použila komerčně dodávaný kit DNeasy Blood and Tissue Kit a postupovala jsem přesně podle návodu k němu přiloženému. Nejprve se malé kousky

drápků nechají inkubovat v roztoku ze 180 μ l pufru ALT a 20 μ l proteinasy K při 56°C, aby se tkáň enzymaticky rozložila. Protože se keratin obtížně lyzuje, inkubace trvá i několik hodin, k urychlení tohoto procesu se může tkáň rozrušovat i mechanicky, například občasným promícháním na vortexu. Poté, co se vzorek dokonale lyzuje, se přidá 200 μ l 96% EtOH a 200 μ l pufru AL. Pomocí speciálních zkumavek s membránou, které jsou součástí kitu se filtruje v centrifuze. Vzorek DNA se zachytí na membráně, která se postupně promývá puframi AW1 a AW2, aby se odstranila proteináza a pufr. Nakonec se membrána promyje puframi AE, tímto krokem se DNA vymyje z membrány a dostane se do roztoku pufru AE, což je obdoba ddH₂O.

Zda vzorky skutečně obsahují izolovanou DNA lze ověřit pomocí rozdělení na agarózovém gelu. Na přípravu 1% agarózového gelu je potřeba: 0,3 g agarózy a 30 ml pufru TBE. Do gelu se ještě před tuhnutím zamíchá 1 μ l ethidiumbromidu, gel se nechá ztuhnout na vaničce. Vzorky DNA se smíchají s barvivem Loading dye, v poměru zhruba 1:5. Takto obarvený vzorek se nanáší na gel. Pro orientační zjišťování DNA ve vzorku stačí, když bude elektroforéza běžet cca 20 minut při napětí 98-99 mV. Po této době je možné sledovat pod UV světlem, zda se ve vzorcích nachází izolovaná DNA či nikoli.

3.3.4. Amplifikace vybraných segmentů DNA pomocí metody PCR

Nejprve aby bylo možné provést amplifikaci vzorků DNA pomocí metody PCR, je nutné objednat primery se sekvencí vhodnou k amplifikaci vybraného genu. Primery jsou komerčně dodávány v koncentrované formě, kterou je před použitím nutné naředit dvojnásobným množstvím ddH₂O než je látkové množství primeru. Tento roztok se nechá přes noc v lednici rozpustit a tím vznikne matrice primeru, zásobí roztok o koncentraci 500 pmol/ μ l. Druhý den se připraví roztok primeru, který se bude používat při PRC, smícháním 1 μ l matrice a 49 μ l ddH₂O jeho koncentrace bude tedy 10 pmol/ μ l.

Poté se připraví reakční směs. Postupně se do 0,5 ml ependorfeku napipetuje 27 μ l ddH₂O, 5 μ l Buffru, 2,5 μ l roztoku MgCl₂, 5 μ l roztoku směsi deoxynukleotidů, 2,5 μ l obou primerů a nakonec *Taq* polymeráza. Po přidání polymerázy do reakční směsi je nutné udržovat roztoky v ledu. Naposledy se do směsi přidává 5 μ l vzorků izolované DNA.

Poté se ependorfky umístí do termocykleru a nastaví se program pro průběh reakčního cyklu. Na začátku programu probíhala denaturace při teplotě 94 °C po dobu 5 minut. dále následovaly 3 fáze, které opakovali:

1. fáze - denaturace 45 s, 94 °C
2. fáze – nasedání primerů 1 s, 56 °C
3. fáze - syntéza DNA 1 min 20 s, 72 °C

Tyto fáze byly opakovány 35krát. Po posledním opakování ještě následovalo prodlužování při teplotě 72 °C po dobu 7 minut. Poté byly produkty PCR ochlazeny a teplotu 10 °C a tím i ukončen program.

3.3.5 Orientační zjištění výsledků amplifikace PCR pomocí rozdělení na agarosovém gelu

Příprava agarosového gelu byla shodná s přípravou gelu pro orientační rozdělení izolované DNA. Stejným principem se nanášeli i vzorky amplifikovaného úseku DNA, které byly rovněž smíchány s barvivem Loading Dye. Ovšem v tomto případě se společně se vzorky nanáší i délkový standard (žebřík), což je směs velikostně přesně definovaných úseků DNA k porovnání délky fragmentů. Žebřík je rozfázovaný po 100 bazích a jeho nejdelší úsek je dlouhý 1000 bází. Při tomto dělení se použije nižší napětí, ale delší doba dělení, 90 mV po 50 min.

4. Výsledky

4.1. Výběr vhodného úseku pro amplifikaci

Na stránkách GENBANK jsem si našla sekvence těchto úseků pro druhy *M. mutica* a *M. annamensis*, které byly použity ve studii Fong *et al.* (2007) a stáhla jsem je ve formátu FASTA.

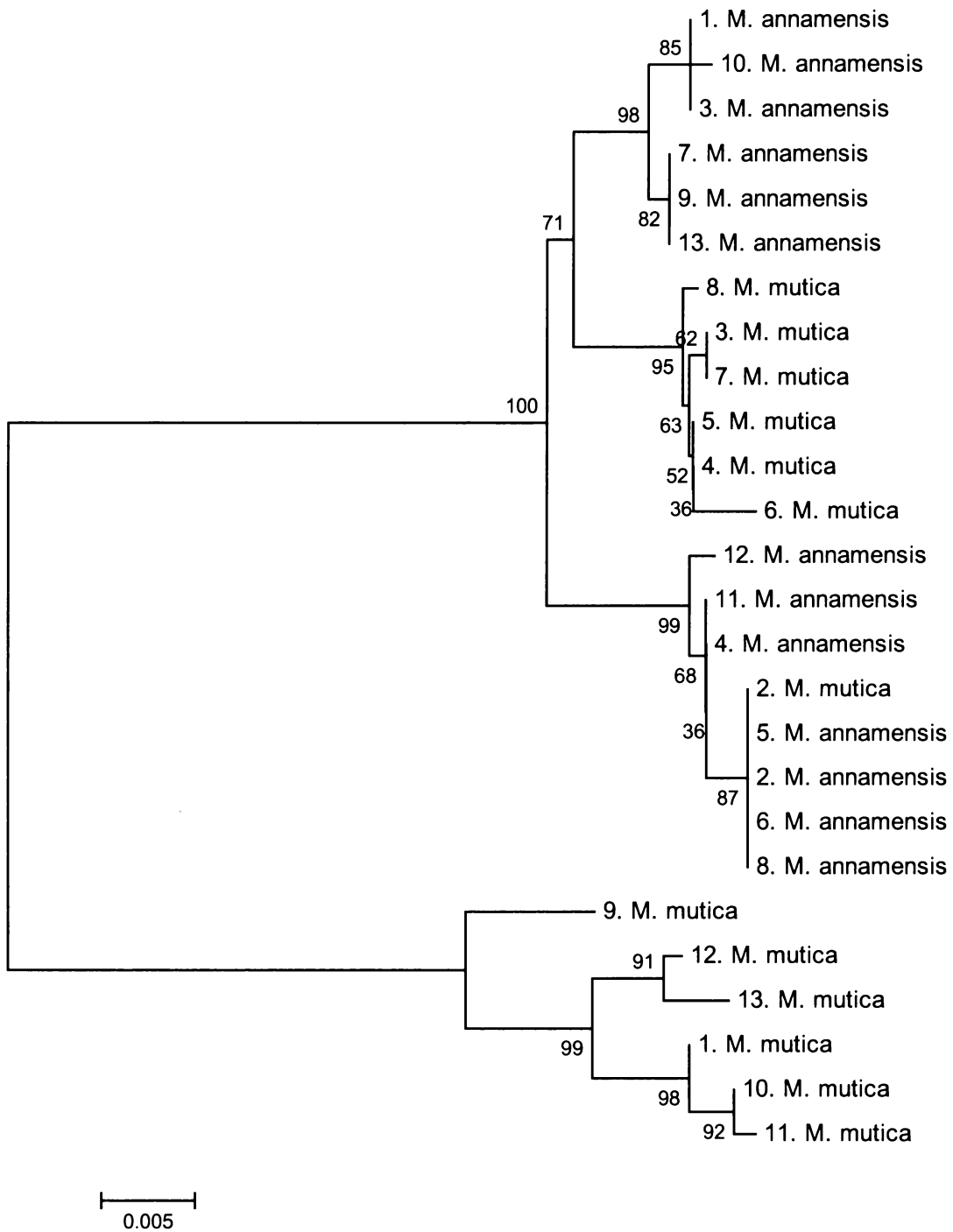
- *M. mutica* – 13 osekvenovaných vzorků. Byly zde výrazné rozdíly mezi dvěmi skupinami těchto vzorků, které se projevily hlavně ve fylogenetickém stromě (viz obr. 6). Tyto skupiny jsou poddruhem *M. mutica*. První skupinou je *M. m. mutica*, takzvaná pravá a nebo také čínská. Druhou skupinu tvoří *M. m. kami* neboli také *M. mutica* vietnamská.

-*M. annamensis* – 13 osekvenovaných vzorků.

Tyto sekvence jsem si zaligovala v programu BioEdit a poté jsem je v programu Mega převedla na soubor s příponou mega. Z něho jsem sestavila fylogenetický strom podle NJ analýzy genu ND4. Gen ND4 je přepisující se gen, tudíž je pod stálou kontrolou a každá odchylka se snaží být opravena podle matrice. Nastavila jsem parametry: bootstrap :1000 replicates, Kimura2 - parameter.

Z fylogenetického stromu je patrné, že rozdíl mtDNA markeru ND4 mezi druhem *M. annamensis* a poddruhem čínské *M. mutica* je dostatečně velký k tomu, aby tento úsek mohl být použit pro účely genetické analýzy. Tím pádem jsem z další analýzy mohla vyřadit vorky 1. *M.mutica* a 9.-13. *M.mutica*. A zaměřila jsem se na hledání mutací v tomto úseku mezi druhem *M. annamensis* a poddruhem vietnamské *M. mutica*. Rovněž jsem vyřadila sekvence vzorku 2. *M. mutica* z tohoto porovnávání. Patrně se jedná o hybrida, vzhledem k jeho umístění na fylogenetickém stromě, ale není možné to tvrdit s jistotou, protože není znám původ tohoto vzorku. Porovnávala jsem tedy zbývající sekvence vzorků 1.-13. *M. annamensis* a 3.-8. *M. mutica*.

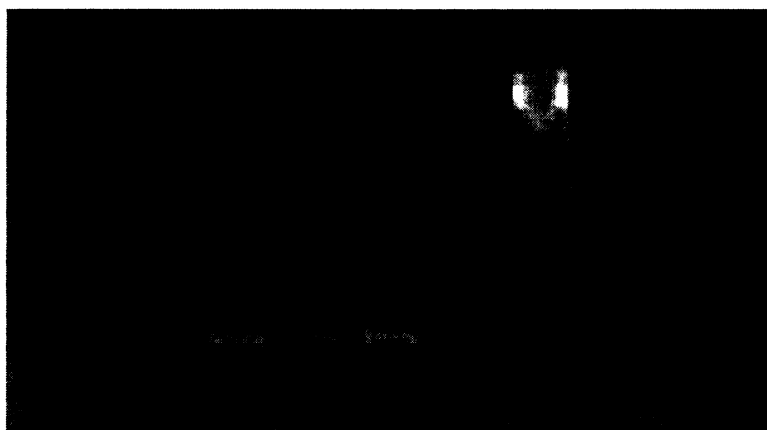
Tyto sekvence jsem porovnávala v programu BioEdit. Našla jsem 5 pozic, které ukazují jednoznačný rozdíl mezi těmito skupinami. Tyto mutace byly na pozicích 125, 260, 548, 698 a 788 (viz příloha). Z rozmístění těchto rozdílů je patrné, že se nemůže jednat o jednu mutaci, vzhledem k jejich vzdálenosti. Také jsem díky tomuto rozmístění zjistila, že má smysl sekvenovat celý úsek tohoto mitochondriálního markeru, sekvenování pouze části markeru by podalo nedostačující informace.



Obr. 6: Fylogenetický strom ukazující výsledky NJ analýzy mitochondriálního markeru ND4 (Parametry: bootstrap: 1000 replicates, Kimura2- parametr)

4.2. Vybrat pro odběr vhodné tkáně a izolovat z nich DNA.

Vzhledem ke jednoduchosti odběru a vlastním zkušenostem s tímto odběrem jsem si vybrala k extrakci tkáň z želvích drápků. U pěti zkoumaných zvířat jsem odebrala vzorky drápků. Z této tkáně jsem izolovala DNA podle postupu ke komerčně dodávanému kitu DNeasy Blood and Tissue Kit. Úspěšnost této izolace jsem si ověřila na agarózovém gelu, který jsem si posléze vyfotila pod UV světlem.

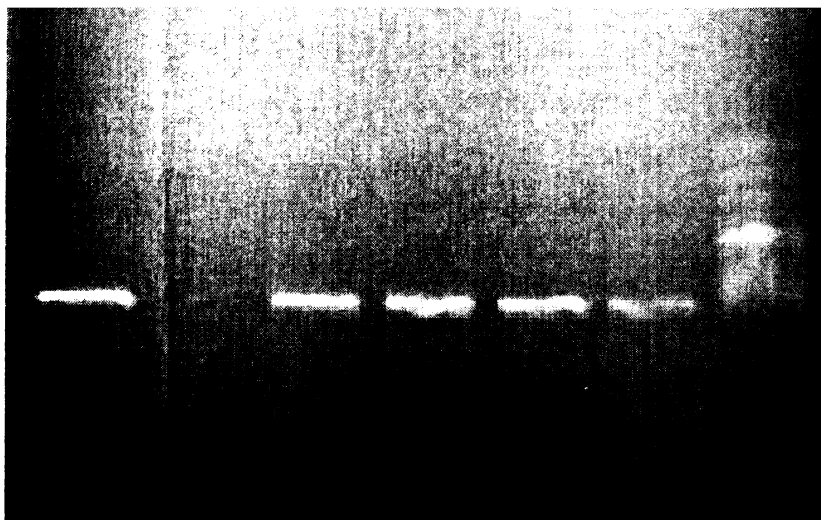


Obr. 7: Izolovaná DNA

Z obrázku tohoto gelu lze říct, že výtěžnost tohoto způsobu izolace je dobrá, není zde patrná kontaminace vzorku z vody. Vzhledem k tomu, že želvy jsou krmeny kuřecími játry, mohla by voda obsahovat bílkoviny, které by mohly kontaminovat odebrané vzorky drápků. Při tomto způsobu odběru vzorku DNA je důležitá snadnost a dostupnost.

4.3. Provést u několika jedinců pomocí metody PCR namnožení vybraného úseku DNA v kvalitě vhodné k sekvenaci.

Pomocí metody PCR jsem amplifikovala vybraný úsek DNA, tedy ND4 marker, obsahující nejen oblast kódující nikotinamid dehydrogenázovou podjednotku, ale i další oblasti kódující celé geny a nebo jen jejich část. Zda byla reakce PCR úspěšná jsem si opět ověřila na agarózovém gelu, který jsem si pod UV světlem vyfotila.



Obr. 8: Amplifikovaný ND4 marker

Z tohoto obrázku je patrné, že se reakcí PCR amplifikoval úsek DNA, jehož délka je pod 1000 bází, což by odpovídalo zhruba délce ND4 markeru. Zda se opravdu jedná o tento úsek, je třeba ověřit dalším postupem, přečištěním amplifikované DNA a následnou sekvenací produktu PCR.

5. Diskuze

V případě, že by se mi podařilo nasekvenovat aplifikované geny od všech zakladatelských jedinců z evropských zoologických zahrad, mohly by se podle nich vyřadit ze vzorků těchto jedinců čínské *M. mutica*. Zalignováním dostupných sekvencí stažených z GENBANK jsem našla pět bází, které jsou rozmístěné v různých částech markeru ND4, což nasvědčuje tomu, že se nejedná o jednu mutaci tohoto úseku. Díky těmto pěti oblastem je možné od sebe jednoznačně rozlišit mitochondriální linie patřící vietnamské *M. mutica* a *M. annamensis*. Tento marker zjednodušuje určení případné hybridizace. V kombinaci s jaderným markerem R35, který se podle publikovaných údajů jednoznačně liší mezi *M. annamensis* a oběma formami *M. mutica*, by bylo možné určit některé z hybridů vzniklých uměle v chovech na farmách i v zoologických zahradách. Vzhledem k tomu, že způsob dědění jaderných a mitochondriálních genů je odlišný, je tato kombinace vhodná k odhalení potenciální hybridizace.

Z publikovaných údajů jsem zjistila, že vietnamská *M. mutica* má mtDNA bližší *M. annamensis*, je tedy možné že vietnamská *M. mutica* je přírodním hybridem *M. annamensis* a číské *M. mutica*, měla by se tedy brát jako samostatná skupina. Proto se v záchranných programech musí tyto linie od sebe oddělovat a vyřadit nedávné hybridy, vzniklé umělou hybridizací.

6. Použitá literatura

- 1 Artner, H. a Hofer, A. (2001). Observation in the Quing Ping Free Market, Guangzhou, China, November 2000. *Turtle and Tortoise Newseller* 3.
- 2 Avise, J.C. (1994). *Molecular markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.
- 3 Barber, R.C., Fontaine, C.T., Flanagan, J.P. a Louis, E.E. (2003). Natural hybridization between a Kamp'Ridley (*Lepidochelys kempii*) and Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*) confirmed by molecular analysis. *Chel. Conserv. and Biology*, 4, 701-704.
- 4 Barth, D., Bernhard, D., Guicking, D., Stock, M., Fritz, U. (2003). Is *Chinemys magalocephala* Fang, 1934 a valid species? New insights based on mitochondrial DNA sequence data. *Salamandra* 38, 233-244.
- 5 Barth, D., Bernhard, D., Fritsch, G., Fritz, U. (2004). The freshwater turtle genus *Mauremys* (Testudines, Geoemydidae) – a textbook example of an east-west disjunction or a taxonomic misconception? *Zoologica Scripta* 33, 213-221.
- 6 Barton, N.H. (2001). The role of hybridisation in evolution. *Molecular Ecology* 10(3), 551-568.
- 7 Birkham, J.W. (1975). A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. *Herpetologica* 31, 198-201.
- 8 Boggs, C.L. (2001). Species and speciation. *International Encyclopedia of the Social and Behavioral Sciences*, 14855-14861.
- 9 Bonin, F., Devaux, B., Dupré, A. (2006). *Turtles of the World*. A and C Black Publishers LTD, UK.
- 10 Bramble, D.M. (1974). Emydid shell kinesis: Biomechanics and evolution. *Copeia* 1974, 707-727.
- 11 Bullini, L. a Nascetti, G. (1990). Speciation by hybridisation in phasmids and other insects. *Can. J. Zool.* 68, 1747-1760.
- 12 Bullini, L. (1994). Origin and evolution of animal hybrid species. *Elsevier science*, vol. 9.
- 13 Burke, J.M. a Arnold, M.L. (2001). Genetics and the fitness of hybrids. *Annu. Rev. Genet.* 35, 31-52.

- 14 Burns, R., Nichols, L. O., Martindale-Adams, J., Graney, M. J., Lummus, A. (2003). Primary care interventions for dementia caregivers: 2-year outcomes from the REACH study. *The Gerontologist*, 43, 547-555.
- 15 Buskirk, J.R., Parham, J.F. & Feldman, C.R. (2005). On the hybridisation between two distantly related Asian turtles (Testudines: *Sacalia_Mauremys*). *Salamandra* 41, 21–26.
- 16 Carr, J.L., Bickham, J.W. (1986). Phylogenetic implications of karyotype variation in the Batagurinae (Testudines: Emydidae). *Genetica* 70, 89-106.
- 17 Diesmos, A.C., Parha, J.F., Stuart, B.L., Brown, R.M. (2005). The phylogenetic position of the recently rediscovered Philippine Forest Turtle (Bataguridae: *Heosemys leytensis*). *Proceeding of th California Academy of Science*, 56, 31-41.
- 18 Dowling, T.E. and Secor, C.L. (1997). The role of hybridisation and introgression in the diversification of animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28, 593-619.
- 19 Ernst, C.H., Barbour, R.W. (1989). *Turtles of the World*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- 20 Ernst, C. H., Altenburg, R. G. M. & Barbour, R. W. (2000). *Turtles of the World*. World Biodiversity Database, CD-ROM Series, Windows, Version 1.2. Amsterdam: Biodiversity Center of ETI.21
- Espenshade, W.H. a Duc, L.T. (2002). Pu Mat Turtle Hunter Interview. *Turtle and Tortoise Newsletter* 5.
- 22 Feldman, C.R. & Parham, J.F. (2004). Molecular systematics of old world stripe-necked turtles (Testudines:Mauremys). *Asiatic Herpetol. Res.* 10, 28–37.
- 23 Flegr, J. (2005). *Evoluční biologie*. Academia.
- 24 Fritz, U. (2001). *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) – Europäische Sumpfschildkröte. In U. Fritz (Ed.) *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*. Schildkröten (Testudines) I (pp. 343–515). Wiebelsheim: Aula.
- 25 Fritz, U., Fattizzo, T., Guicking, D., Tripepi, S., Pennisi, M. G., Lenk, P., Joger, U. & Wink, M. (2005). A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys* (Reptilia, Testudines, Emydidae). — *Zoologica Scripta*, 34, 351–371.
- 26 Fritz, U., Auer, M., Bertolero, A., Cheylan, M., Fattizzo, T., Hundsdörfer, A. K., Martín Sampayo, M., Pretus, J. L., Siroky, P. & Wink, M. (2006). A rangewide

- phylogeography of Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* (Reptilia: Testudines: Testudinidae): implications for taxonomy. — *Zoologica Scripta*, 35, 531–543.
- 27 Fong, J.J., Parham, J.F., Shi, H., Stuart, B.L. & Carter, R.L. (2007). A genetic survey of heavily exploited, endangered turtles: caveats on the conservation value of trade animals. *Animal conservation* 10.
- 28 Friesen, V.L. (2000). Introns. In: A.J. Baker (ed.), *Molecular Methods in Ecology*, pp. 274–294. Blackwell Science, Oxford.
- 29 Gaffney, E.S., Meylan, P.A. (1988). A phylogeny of turtles. In: Benton, M.J. (Ed.), *The Phylogeny and Classification of Tetrapods*. Clarendon Press, Oxford, England, pp. 157–219.
- 30 Georges, A., Adams, M. & McCord, W. (2001). Electrophoretic delineation of species boundaries within the genus *Chelodina* (Testudines: Chelidae) of Australia, New Guinea and Indonesia. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 134, 401–421.
- 31 Grant, P.R., Grant, B.R., Petren, K. (2005). Hybridization in recent past. *The American Naturalist*, Vol. 166, pp. 56–67.
- 32 Guicking, D., Fritz, U., Wink, M., Lehr, E. (2002). New data on the diversity of the Southeast Asian leaf turtle genus *Cyclemys* Bell, 1834. Molecular results (Reptilia: Testudines: Geoemydidae). *Zool. Abh. Staatl. Mus. Tierk. Dresden* 23, 75–86.
- 33 Hirayama, R. (1984). Cladistic analysis of batagurine turtles (Batagurinae: Emydinae: Testudinoidea): A preliminary result. *Studia Geologica Salmanticensia*, vol Especial 1. *Studia Palaeocheloniol.* 1, 141–157.
- 34 Honda, M., Yasukawa, Y., Hirayama, R. and Ota, H. (2002). Phylogenetic relationship of the Asian box turtles of the genus *Cuora* sensu lato (Reptilia: Bataguridae) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Zool. Science* 17, 1305–1312.
- 35 Iverson, J.B. & McCord, W.P. (1989). The proper taxonomic allocations of *Emys nigricans* Gray, *Emys muticus* Cantor, *Geoclemys kwangtungensis* Pope. *Amphibia-Reptilia* 10,
- 36 Iverson, J.B. (1992). A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world. Privately printed, Richmond, IN 23–34.

- 37 Iverson, J.B., McCord, W.P. (1992). A new subspecies of *Cuora galbinifrons* (Testudines: Batagurinae) from Hainan Island, China. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 105, 433–439.
- 38 Iverson, J. B. & McCord, W. P. (1994). Variation in East Asian turtles of the genus *Mauremys*. *Journal of Herpetology*, 28, 178–187.
- 39 Johnson, N.A. and Kliman, R.M. (2002). Hidden evolution: progress and limitations in detecting multifarious natural selection. *Genetica* 114, 281-291.
- 40 Le, M., McCord, W.P., Iverson, J.B. (2007). On the paraphyly of the genus *Kachuga* (Testudines: Geoemydidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45, 398-404.
- 41 Lovich, J.E., Laemertzahl, A.F., Ernst, C.H. a McBreen, J.F. (1991). Relationship among turtles of the genus *Clemmys* (Reptilia, Testudines, Emydidae) as suggested by plastron scute morphology. *Zoological Scripta* 20, 425-429.
- 42 Mallet, J., Neukirchen, W. and Linares, M. (2002). Hybrids between species of *Heliconius* and *Euides* butterflies: a database. <http://www.ucl.ac.uk/taxome/hyb/>.
- 43 Mayr, E. (1963). *Animal Species and Evolution*. Belknap, Cambridge, MA.
- 44 McCord, W.P. (1997). *Mauremys pritchardi*, a new batagurid turtle from Myanmar and Yunnan, China. *Chelonian Conserv. Biol.* 2, 555–562.
- 45 McDowell, S.B. (1964). Partition of the genus *Clemmys* and related problems in the taxonomy of aquatic Testudinidae. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 143.
- 46 Nosil, P., Vines, T.H., Funk, D.J. (2005). Perspective: Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. *Evolution* 4, 705-719.
- 47 Pacheco, N.M., Congdon, B.C. and Friesen, V.L. (2002). The utility of nuclear introns for investigating hybridisation and genetic introgression: a case study involving *Brachyramphus murrelets*. *Conservation Genetics* 3(2), 175-182.
- 48 Parham, J.F., Simison, W.B., Kozak, K.H., Feldman, C.R. and Shi, H. (2001). New Chinese turtles: endangeres or invalid? A reassessment of two species usány mitochondrial DNA, allozyme electrophoresis and known-locality specimens. *Anim. Conserv.* 4, 357-367.
- 49 Praschag, P., Hundsdörfer, A.K. a Fritz,U. (2007). Phylogeny and taxonomy of endangered South and South-east Asian freshwater turtles elucidated by mtDNA

- sequence variation (Testudines: Geoemydidae: *Batagur*, *Callagur*, *Hardella*, *Kachuga*, *Pangshura*). *Zoological scripta*.
- 50 Pritchard, P.C.H., McCord, W.P. (1991). A new emydid turtle from China. *Herpetologica* 47.
- 51 Průša, R. (1997). *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. 2. lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED spol. s.r.o., Praha.
- 52 Rozsypal, S., Doškař, J., Frynta, D., Homola, J. a kol. (2003). Nový přehled biologie. *Scientia Praha*.
- 53 Salzberg, A. (2001). Turtles for Sale. *Turtle and Tortoise Newseller*, 3.
- 54 Shi, H. a Parham J.F. (2001). Preliminary Observations of a Large Turtle Farm in Hainan Province, People's Republic of China. *Turtle and Tortoise Newseller*, 3.
- 55 Shi, H., Parham, J.F., Simison, W.B., Wang, J., Gong, S. and Fu, B. (2005). A report on the hybridization between two species of threatened Asian box turtles (Testudines. *Cuora*) in the wild on Hainan Island (China) with comments on the origin of 'serrata'-like turtles. *Amphibia-Reptilia* 26, 377-381.
- 56 Schilde, M., Barth, D. a Fritz, U. (2004). An *Ocadia sinensis* x *Cyclemys shanensis* hybrid (Testudines: Geoemydidae). *Asiatic Herpetological Research*, 10:120-125.
- 57 Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and Flook, P. (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers. *Ann.Entom.Soc.Am.* 87(6), 651-701.
- 58 Sites, J. W., Bickham, J. W., Pytel, B. A., Greenbaum, I. F. & Bates, B. A. (1984). Biochemical characters and the reconstruction of turtle phylogenies: relationships among batagurine genera. *Systematic Zoology*, 33, 137–158.
- 59 Spinks, P.Q., Shaffer, H.B., Iverson, J.B. and McCord, W.P. (2004). Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. *Evol.* 32, 164-182.
- 60 Spinks, P.Q. & Shaffer, H.B. (2007). Conservation phylogenetics of the Asian box turtles (Geoemydidae, *Cuora*): mitochondrial introgression, numts, and inferences from multiple loci. *Conserv. Genet.* 8, 641–657.
- 61 Stuart, B.L., Parham, J.F. (2004). Molecular phylogeny of the critically endangered Indochinese box turtle (*Cuora galbinifrons*). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31, 164-177.

- 62 Stuart, B.L. and Parham, J.F. (2007). Recent hybrid origin of three rare Chinese turtles. *Conserv. Genet.* 8, 169-175.
- 63 van Dijk, P.P., Stuart, B.L., Rhodin, A.G.J. (2000). Asian Turtle Trade: Proceedings of a workshop on Conservation and Trade of Freshwater Turtles and Tortoises in Asia. Chelonian Research Foundation. MTC Printing, Lunenburg, MA.
- 64 Wink, M., Guiking, D., Fritz, U. (2001). Molecular evidence for hybrid origins of *Mauremys iversoni* Pritchard and McCord, 1991, and *Mauremys pritchardi* McCord, 1997 (Reptilia: Testudines: Bataguridae). *Zool. Abh. Staatl. Mus. Tierk. Dresden* 52, 41–49.
- 65 Yasukawa, Y., Hirayama, R., Hikida, T. (2001). Phylogenetic relationships of geoemydine turtles (Reptilia: Bataguridae). *Curr. Herpetol.* 20, 105-133.

7. Příloha – vybrané sekvence mitochondriálního markeru obsahující odlišnosti

	110	120	130	140	150	
13.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGT	TTTATCTGCC
1.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGT	TTTATCTGCC
2.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
3.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGT	TTTATCTGCC
4.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
5.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
6.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
7.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGT	TTTATCTGCC
8.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
9.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGT	TTTATCTGCC
10.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGT	TTTATCTGCC
11.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCGTTAT	GAGG	GTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
12.M.a.	ATTCATAATA	TTAGCATTAT	GAGG	ATGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
8.M.m.	ATTCATAATA	TTAGCATTAT	GAGG	GGTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
3.M.m.	ATTCATAATA	TTAGCATTAT	GAGG	GGTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
4.M.m.	ATTCATAATA	TTAGCATTAT	GAGG	GGTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
5.M.m.	ATTCATAATA	TTAGCATTAT	GAGG	GGTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
6.M.m.	ATTCATAATA	TTAGCATTAT	GAGG	GGTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC
7.M.m.	ATTCATAATA	TTAGCATTAT	GAGG	GGTGAT	CATGACCGGC	TTTATCTGCC

	260	270	280	290	300
13.M.a.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
1.M.a.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
2.M.a.	CGGAGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
3.M.a.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
4.M.a.	CGGAGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
5.M.a.	CGGAGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
6.M.a.	CGGAGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
7.M.a.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
8.M.a.	CGGAGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
9.M.a.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
10.M.a.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
11.M.a.	CGGAGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
12.M.a.	CGGAGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
8.M.m.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
3.M.m.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
4.M.m.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
5.M.m.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
6.M.m.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT
7.M.m.	CGGGGCTAT	ACACTTATAA	TTGCCACGG	CTTAACATCA	TCAATACTTT

		510	520	530	540	550
13.M.a.	CTAATAACAG	GACTGGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
1.M.a.	CTAATAACAG	GACTGGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
2.M.a.	CTAATAACAG	GATTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
3.M.a.	CTAATAACAG	GACTGGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
4.M.a.	CTAATAACAG	GATTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
5.M.a.	CTAATAACAG	GATTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
6.M.a.	CTAATAACAG	GATTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
7.M.a.	CTAATAACAG	GACTGGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
8.M.a.	CTAATAACAG	GATTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
9.M.a.	CTAATAACAG	GACTGGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
10.M.a.	CTAATAACAG	GACTGGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
11.M.a.	CTAATAACAG	GATTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
12.M.a.	CTAATAACAG	GATTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
8.M.m.	CTAATAACAG	GACTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
3.M.m.	CTAATAACAG	GACTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
4.M.m.	CTAATAACAG	GACTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
5.M.m.	CTAATAACAG	GACTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
6.M.m.	CTAATAACAG	GACTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT
7.M.m.	CTAATAACAG	GACTAGGAAC	CTTACTAACC	GCCACCTATA	CCCTATA	AT

	
		660	670	680	690	700
13.M.a.	ATAGCATTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAGTGCC	
1.M.a.	ATAGCATTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAATGCC	
2.M.a.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAAA	ACCAGGACTA	ATCCAAGGCA	CCTAAGTGCC	
3.M.a.	ATAGCATTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAATGCC	
4.M.a.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAAA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCA	CCTAAGTGCC	
5.M.a.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAAA	ACCAGGACTA	ATCCAAGGCA	CCTAAGTGCC	
6.M.a.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAAA	ACCAGGACTA	ATCCAAGGCA	CCTAAGTGCC	
7.M.a.	ATAGCATTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAGTGCC	
8.M.a.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAAA	ACCAGGACTA	ATCCAAGGCA	CCTAAGTGCC	
9.M.a.	ATAGCATTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAGTGCC	
10.M.a.	ATAGCATTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAATGCC	
11.M.a.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAAA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCA	CCTAAGTGCC	
12.M.a.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAAA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCA	CCTAAGTGCC	
8.M.m.	ATAGCATTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAGT CC	
3.M.m.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAAT CC	
4.M.m.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAGT CC	
5.M.m.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAGT CC	
6.M.m.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAGT CC	
7.M.m.	ATAGCGTTGC	TAATAGTAGA	ACCAGAACTA	ATCCAAGGCG	CCTAAAT CC	

	760	770	780	790	800	
13.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
1.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
2.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
3.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
4.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
5.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
6.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
7.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
8.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
9.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
10.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
11.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
12.M.a.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
8.M.m.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
3.M.m.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
4.M.m.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
5.M.m.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
6.M.m.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA
7.M.m.	ATAGGAGTTT	AAATCTCCTT	ATAAACCGAG	AGAGGTA	CA	TACAATAAGA