

# USING OF DNA FROM DIFFERENT TISSUES OF RAPTORS (*FALCONIFORMES*) FOR STUDYING GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE

**Bryndova M., Kourkova L., Urban T.**

Department of Morphology, Physiology and Animal Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: [xbryndov@node.mendelu.cz](mailto:xbryndov@node.mendelu.cz)

---

## ABSTRACT

The main aim of this study was to choose the most suitable tissues for isolation DNA, which could be used for the next analysis. The other aim was to test microsatellite markers and estimate genetic structure in the population of the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and the saker falcon (*Falco cherrug*). We used the dataset of 21 individuals, which was divided into two populations according to their species. The sample sizes were 14 individuals of the peregrine falcon and 7 individuals of the saker falcons living in the Czech Republic. DNA was extracted from different tissues (feathers, buccal swabs, skin, skin from the foot pads and claws) by JETQUICK® tissue DNA spin kit. Comparing all tissues in the electrophoresis gel feathers were the most useful for the next analysis. Detection of alleles of 5 microsatellites (NVH fp89, NVH fp13, NVH fp31, NVH fp92-1, NVH fp79-4) was based on the multiplex PCR reaction and the fragmentation analysis. We evaluated the standard statistical values (number of alleles, allele frequencies, polymorphism information content, theoretical heterozygosity, observed heterozygosity and F statistics). Our research will be continued with optimizing methods for 10 microsatellites panel and isolation DNA from museum specimens, which provides the study of genetic variability and diversity birds of prey throughout the time.

**Key words:** raptors, microsatellites, isolation DNA, population structure, genetic variability

**Acknowledgments:** This study was supported by IGA AF MZLU Brno, Czech Republic (project No. DP 4/2009).

## ÚVOD

Analýza DNA patří mezi nepoužívanější metody pro studium genetické diverzity a struktury populací. Stala se důležitým nástrojem pro fylogenetické studie, studium ekologie a konzervační genetiky dravců. Důležitým aspektem je co nejméně invazivní získání vzorků z biologického materiálu. Nejběžněji používanou tkáň je krev, jejíž získání je u volně žijících dravců značně obtížné. Z tohoto důvodu byly hledány další vhodné tkáně, které by mohly být využity k izolaci DNA. Jedná se především o peří, stěry z bukálních sliznic, šupinky ze stojáků, drápy, kousky epitelální tkáň a zbytky skořápek vajec.

Izolovaná DNA může být dále použita pro další analýzy. V našem případě pro studium genetické diverzity pomocí mikrosatelitních markerů. Mikrosatelity poskytují informace použitelné pro ověřování rodičovství nebo mezipopulační charakteristiky. Díky nejruznějším statistickým programům můžeme stanovit hodnoty jako např. počet alel, frekvence alel, frekvence genotypů, polymorfní informační obsah, teoretická heterozygotnost, pozorovaná heterozygotnost, F statistiky a další.

Hlavním cílem naší studie bylo vybrat nevhodnější tkáň pro izolaci DNA, která by byla využitelná i pro další analýzy, otestovat vhodné mikrosatelitní markery a odhadnout genetickou strukturu populace sokola stěhovavého (*Falco peregrinus*) a raroha velkého (*Falco cherrug*).

## MATERIÁL A METODIKA

Referenční skupina vzorků obsahovala celkem 21 jedinců pocházejících z České republiky (z toho 14 sokolů stěhovavých a 7 rarohů velkých).

DNA byla extrahována z peří, epitelální tkáň na stojácích, bukálních stěrů a drápů za použití izolačního kitu Jetquick® tissue DNA spin kit (Genomed, Germany) dle doporučených instrukcí. Pera byla získána vytržením (jednalo se o krycí pera z oblasti pod křídlem a hrudní oblasti) nebo vypelicháním (použita byla pera krycí, letková a rýdovací). Pro izolaci byl použit bazální konec brka společně s krevní sraženinou superior umbilicus nacházející se těsně pod praporovou částí (Horvath *et al.*, 2005). Epitelální tkáň byla použita z jednotlivých kožních štítků a polštářků ze spodní strany stojáků u muzejních preparátů, z muzejních preparátů byl odebrán i kousek drápu. Pro bukání stěr byl využit vatový tampon a stěr byl proveden z vnitřní strany dutiny zobáku. Vizualizace byla provedena pomocí elektroforézy na 1,5 % agarózovém gelu.

Pro PCR reakci bylo použito 5 párů primerů (značený primer A) pro 5 mikrosatelitů NVHfp89, NVHfp13, NVHfp31, NVHfp79-4, NVHfp92-1 (Nesje *et al.*, 2000). PCR amplifikace proběhla v celkovém objemu 6,25  $\mu$ l. Složení multiplexní PCR je možné vidět v Tab. 1. Podmínky cyklování (GeneAmp PCR System 9700 cycler) byly 10 min při 95 °C; následovalo 30 cyklů (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min); 60 min při 72 °C; 4 °C  $\infty$ .

Dále byla provedena fragmentační analýza s vizualizací detekovaných mikrosatelitů pomocí ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA USA). 0,6  $\mu$ l PCR

produktu bylo smícháno s 0,5  $\mu$ l GeneScan - 500 ROX Size Standard a 11,5  $\mu$ l formamidu. Pro vyhodnocení byl použit software firmy Applied Biosystems GeneScan  $\text{\textcircled{R}}$  3.7 NT a Genotyper  $\text{\textcircled{R}}$  3.7 NT.

Pro odhad statických hodnot jsme použili program GENEPOP ver. 1.2 (Raymond *et al.*, 1995) a MICROSATELLITE TOOLKIT ver. 3.1.1 (Park, 2001). Stanovili jsme počet alel, alelové frekvence, genotypové frekvence, polymorfní informační obsah (Botstein *et al.*, 1980), teoretickou a pozorovanou heterozygotnost (Hedrick, 1983), F statistiky (Weir *et al.*, 1984) (Robertson *et al.*, 1984).

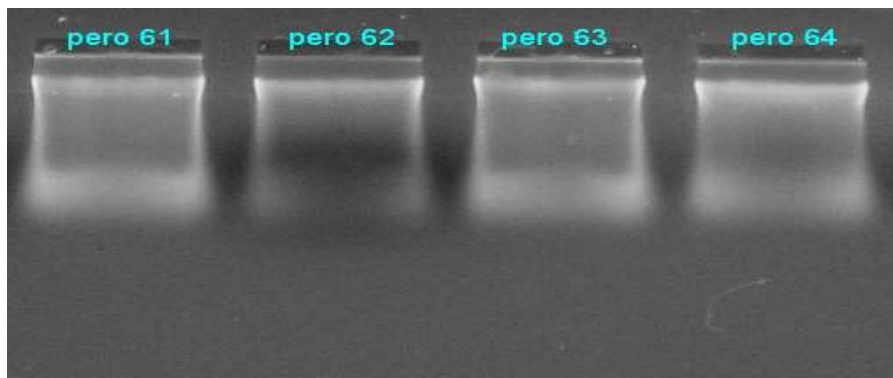
Tab. 1 Složení PCR master mixu

Reagenty	Množství v reakci ( $\mu$ l)	Konečná koncentrace
Deionizovaná voda	2,64	
10 $\times$ PCR Pufr I:	0,75	1,2 $\times$ 1,8 mM
DMSO	0,19	3%
NVH fp89 (10/10)	0,25/0,25	400 nM
NVH fp13 (10/10)	0,13/0,13	200 nM
NVH fp31 (10/10)	0,13/0,13	200 nM
NVH fp92-1 (10/10)	0,19/0,19	300 nM
NVH fp79-4 (10/10)	0,19/0,19	300 nM
10mM DTP mix	0,21	336 $\mu$ M
5U/ $\mu$ l Taq Gold	0,18	0,9 U
DNA	0,5	10-100 ng/ $\mu$ l

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Při vizualizaci izolované DNA na agarózovém gelu jsme mohli sledovat její kvalitu. Nejlepší kvalita byla pozorována u DNA získané z perí, především u čerstvě vytržených krycích per viz Obr. 1. U vypelichaných per (letkových a rýdovacích) byla kvalita sice nižší, ale dostačující pro další analýzu (PCR reakce a fragmentační analýza) (Horvath *et al.*, 2005). Dokonce i jedno vypelichané pero staré několik let postačilo ke stanovení mikrosatelitů (Obr. 2). Další tkáň, kterou jsme testovali podle studie Mundy *et al.* (1997), byly kousky epiteliální tkáně ze stojádků, která se ukázala jako další možná alternativa pro izolaci DNA z muzejních vzorků (Obr. 3) Pro zvýšení efektu jsme použili dvě vytržená pera. Preparáty poskytují i další zdroje DNA, my jsme vyzkoušeli i drápy (Allouche *et al.*, 2008), které ale neposkytly očekávané výsledky. Hlavním důvodem pravděpodobně byla malá velikost odebraného vzorku, nedostatečná homogenizace a značné stáří preparátů. Handel *et al.* (2006) testují bukální stěry ze zobáku především u malých pěvců a úspěšně je využívají pro mikrosatelitní analýzu a sekvenování mitochondriální DNA. Nám se nepodařilo DNA z bukálního stěru úspěšně izolovat, což mohlo být způsobeno špatným způsobem odběru, velkou mírou znečištění např. potravou a nesprávným výběrem izolačního kitu (Obr. 3).

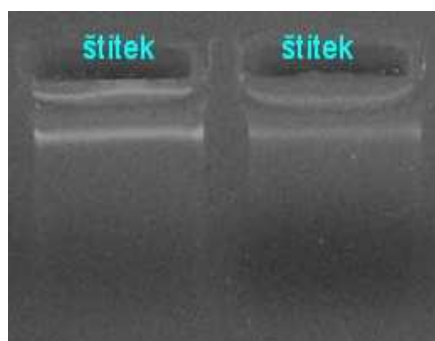
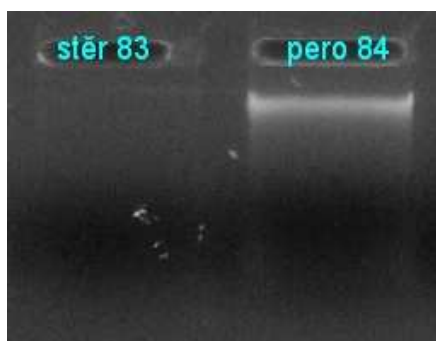
Obr. 1 Vizualizace izolované DNA z peří na gelu, vzorky 61, 62, 63, 64



Obr. 2 Porovnání koncentrace vyizolované DNA z kousku epitelální tkáně s krví a jedním vypelichaným



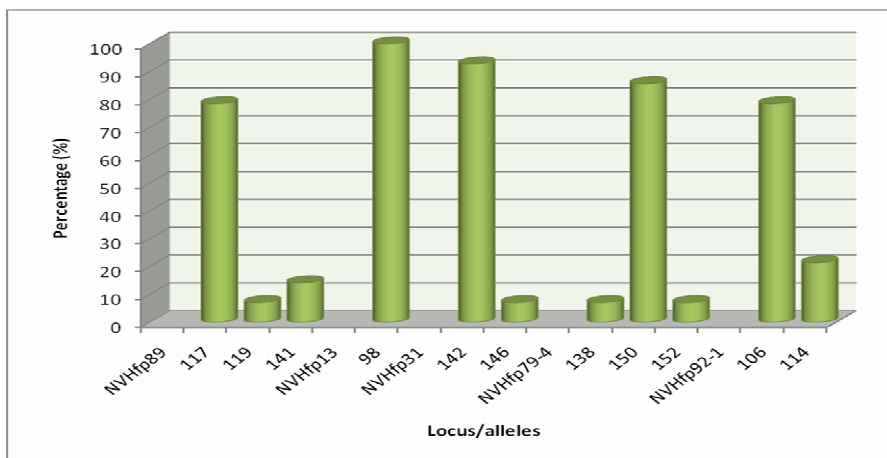
Obr. 3 Porovnání koncentrace vyizolované DNA mezi vzorkem 83 (stěr z bukání sliznice), 84 (pero) a DNA ze štítků na stojácích



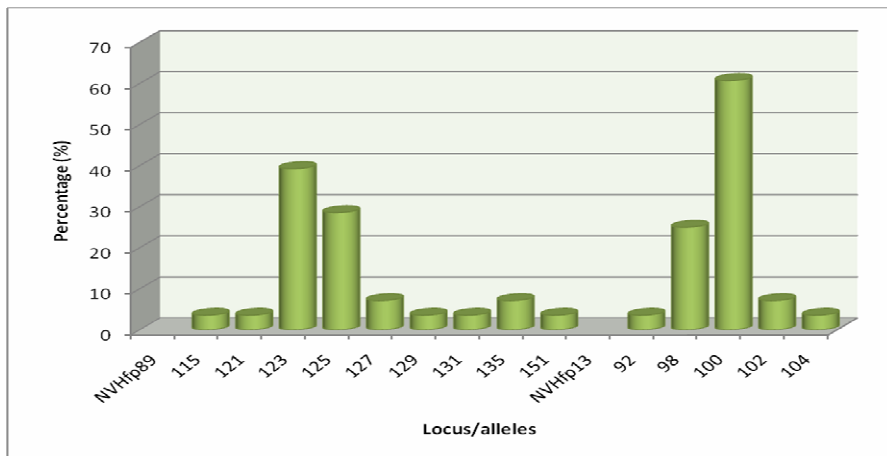
V porovnání s Nesje *et al.* (2000a, 2000b) a Nittinger *et al.* (2007) jsem z celkových 38 různých alel detekoval 9 unikátních, které budou pravděpodobně typické pro populaci sokola stěhovavého a raroha velkého žijících v České republice. Pro sokola stěhovavého to byla alela 92 na lokusu NVH fp13 a alely 115 a 151 na lokusu NVH fp89, pro raroha velkého alely 142 a 146 na lokusu NVH fp31, alela 138 na lokusu NVH fp79-4 a alely 117, 119, 141 na lokusu NVH fp89.

Alelové frekvence u populace sokola stěhovavého se pohybovaly od 0,0357 do 0,6786. Nejvíce frekventovaná byla alela 116 (NVHfp92-1), naopak nejméně alely 115, 121, 129, 131, 151 (NVHfp89), 92, 104 (NVHfp13), 146, 156, 158, 164 (NVHfp79-4) (Graf 2, 3). U raroha velkého byly frekvence ovlivněny počtem jedinců, proto se zde objevil i jeden monomorfní lokus (alela 98 lokus NVHfp13). Nejmenší frekvenci (0,0714) vykazovaly alely 119 (lokus NVHfp89), 146 (lokus NVHfp31) a 138, 152 (lokus NVHfp79-4) (Graf 1).

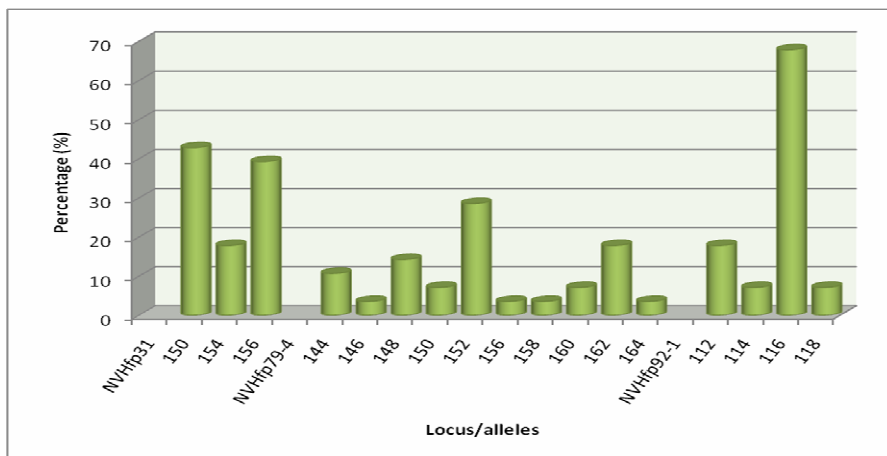
Graf 1 Grafické znázornění alelových frekvencí pro všechny mikrosatelity u raroha velkého



Graf 2 Grafické znázornění alelových frekvencí pro všechny mikrosatelity u sokola stěhovavého



Graf 3 Grafické znázornění alelových frekvencí pro všechny mikrosatelity u raroha velkého



Obě populace sokola stěhovavého i raroha velkého byly v Hardy-Weinbergerově rovnováze ( $P = 0,2804, 0,5211$ , hodnoty se pohybovaly od 0,0751 do 1,0 a od 0,0617 do 0,7070).

Pozorovaná heterozygotnost byla spočítána od hodnoty 0,14 (NVH fp31, NVH fp79-4, raroh velký) po hodnotu 0,86 (NVH fp79-4, sokol stěhovavý), očekávaná heterozygotnost byla od 0,14 do 0,87 pro stejné lokusy a druhy jako v předchozím případě. Nejvyšší polymorfní informační obsah byl kvantifikován pro sokola stěhovavého v lokusu NVH fp79-4 (0,82), nejnižší PIC pro raroha velkého v lokusu NVH fp31 (0,12).

Celkové F statistiky jsou popsány v tabulce 2. Průměrné ukazatele pro všechny lokusy a pro obě populace byly  $F_{IS} = 0,114$ ,  $F_{ST} = 0,463$ ,  $F_{IT} = 0,524$ . Průměrná hodnota  $F_{IS}$  vyjadřuje optimální počet heterozygotů pro populaci sokola stěhovavého a raroha velkého. Nejnižší hodnoty vykazuje lokus NVHfp89 ( $F_{IS} = 0,047$ ,  $F_{ST} = 0,388$ ,  $F_{IT} = 0,417$ ). Naopak nejvyšší hodnoty byly spočítány pro lokus NVHfp92-1 ( $F_{IS} = 0,190$ ,  $F_{ST} = 0,533$ ,  $F_{IT} = 0,622$ ).

Tab. 2 Celkové F statistiky pro všechny mikrosatelity a populace sokola stěhovavého a raroha velkého

Lokus	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
NVHfp89	0,047	0,388	0,417
NVHfp13	0,158	0,529	0,604
NVHfp31	0,126	0,546	0,603
NVHfp79-4	0,089	0,328	0,388
NVHfp92-1	0,190	0,533	0,622
	0,114	0,463	0,524

## ZÁVĚR

Jako nejlépe využitelnou tkáň pro získání kvalitní DNA jsme vybrali peří, pro odběr z muzejních preparátů se jeví jako nejlepší šupinky nebo jakýkoliv kousek epiteliální tkáně ze stojáků případně v kombinaci s peřím. Testování mikrosatelitů pomocí fragmentační analýzy ukázalo

spolehlivost těchto genetických markerů pro populaci sokola stěhovavého a raroha velkého žijících v České republice. Vzhledem k nízkému počtu jedinců mají výsledky související s genetickou diverzitou menší vypovídací hodnotu, proto i nadále pracujeme na rozšíření naší DNA banky. Testujeme nový panel 10ti mikrosatelitů, který bude použit pro zpřesnění výsledků a může sloužit i k ověřování rodičovství u dravců.

## LITERATURA

ALLOUCHE, M., HAMDOUN, M., MANGIN, P., CASTELLA, V. (2008). Genetic identification of decomposed cadavers using nails as DNA source. *Forensic Science International: Genetics* 3: 46–49.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32 : 314–331

HANDEL, C., M., PAJOT, L., M., TALBOT, S., L., SAGE, G., K. (2006). Use of buccal swabs for sampling DNA from nestling and adult birds. *Wildlife society bulletin* 34(4): 1094–1100.

HEDRICK, P.W. (1983) *Genetics of Populations*, Science Books International, Boston

HORVATH, M. B., MARTINEZ-CRUZ, B., NEGRO, J. J., KALMAR, L., GODOY, J. A. (2005). An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of avian biology* 36: 84 - 88.

MUNDY, N.I., UNITT, P., WOODRUFF, D. S. Skin From Feet of Museum Specimens as a Non-destructive Source of DNA for Avian Genotyping. (1997). *The Auk* 114(1):126-129.

NESJE, M., RØED, K. H., BELL, D. A., LINDBERG, P. & LIFJELD, J. T. (2000a). Microsatellite analysis of population structure and genetic variability in peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Animal Conservation* 3: 267–275

NESJE, M., RØED, K. H., LIFJELD, J. T., LINDBERG, P. & STEEN, O. F. (2000b). Genetic relationships in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. *Mol. Ecol.* 9: 53–60.

NITTINGER, F., GAMAUF, A., PINSKER, W., WINK, M., HARING, E. Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: mitochondrial and microsatellite data. (2007). *Molecular Ecology* 16, 1497–1517

The Excel Microsatellite Toolkit:

PARK, S. D. E. (2001). Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [ Ph.D. thesis (in prep.)], University of Dublin

RAYMOND, M., ROUSSET, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.

ROBERTSON, A., HILL, W. G. (1984). Deviations from Hardy–Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics*, 107: 703–718.

RUDNICK, J. A., KATZNER, T. E., BRAGIN, E. A. & DEWOODY, J. A. (2007). Species identification of birds through genetic analysis of naturally shed feathers. *Mol. Ecol.* 7: 757–762

WEIR, B. S., COCKERHAM, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, vol. 38, no. 6, p. 1358-1370.