

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Martina Paprskářová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů
z řádu brodiví u marabu afrického
(*Leptoptilus crumeniferus*)**

Bakalářská práce

Martina Paprskářová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

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.....

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho odborné rady, ochotu, trpělivost a čas, které mi věnoval při psaní této bakalářské práce. Děkuji také svým kolegyním z Laboratoře populační genetiky za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Souhrn

Marabu africký (*Leptoptilos crumeniferus*) je velký mrchožravý pták patřící do řádu brodiví (Ciconiiformes) žijící v subsaharské Africe. I když je to velmi rozšířený druh, nebyly u něj prozatím popsány žádné polymorfní mikrosatelitové lokusy.

V teoretické části této bakalářské práce jsem se zabývala zpracováním informací o řádu brodiví (Ciconiiformes), čeledi čápopovití (Ciconidae) a marabu africkém. Toto je obsahem první kapitoly. Dále jsem hledala informace o partnerských vztazích mezi ptáky. Poté jsem sbírala materiály o rozptýlené a tandemově repetitivní DNA. Věnovala jsem se popisu satelitů, minisatelitů a mikrosatelitů. Poslední kapitola teoretické části této bakalářské práce je věnována analýze mikrosatelitových lokusů.

V experimentální části jsem hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy metodou *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových primerů. Otestovala jsem všechny páry primerů odvozených od druhů z řádu brodiví (Ciconiiformes), potápky (Podicipediformes) a potáplice (Gaviiformes) a několik párů primerů odvozených od druhů z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), vrubozobí (Anseriformes) a tučňáci (Sphenisciformes).

Z celkového počtu 187 mikrosatelitových párů primerů jsem našla 29 polymorfních. Celkem 28 mikrosatelitových párů primerů bylo odvozeno od druhů z řádu brodiví. Jeden polymorfní mikrosatelitový lokus byl amplifikován pomocí páru primerů navrženého pro druh z řádu dlouhokřídlí. Tři páry primerů poskytly PCR amplifikací dva mikrosatelitové lokusy a jeden pár primerů poskytl tři polymorfní mikrosatelitové lokusy. Počet alel se pohyboval mezi 2–8.

Summary

Marabou Stork (*Leptoptilos crumeniferus*) is a large vulture bird belonging to the order of Ciconiiformes that lives in sub-Saharan Africa. Although this is a very widespread species, no polymorphic microsatellite loci were described for him so far.

In the theoretical part of my bachelor thesis I dealt with processing information about the order Ciconiiformes, family Ciconidae and the Marabou Stork. This is the content of the first chapter. I also found information about the relationships among birds. Then I collected materials about the tandem and interspersed repetitive DNA. I also wrote the description of the satellites, minisatellites and microsatellites. The last chapter of theoretical part of my bachelor thesis is devoted to the analysis of microsatellite loci.

In the experimental part, I looked for polymorphic microsatellite loci by *cross-species* PCR amplification of microsatellite primers. I tested all primer pairs derived from species belonging to orders Ciconiiformes, Podicipediformes and Gaviiformes and several primer pairs derived from species of the order Charadriiformes, Anseriformes and Sphenisciformes.

I found 29 polymorphic microsatellite primer pairs of the total 187 tested. A total of 28 microsatellite primer pairs were derived from species of the order Ciconiiformes. Only one polymorphic microsatellite locus was amplified using primer pair derived from the order Charadriiformes. Three pairs of primers PCR amplification amplified two microsatellite loci and one primer pair amplified three polymorphic microsatellite loci. Number of alleles per locus ranged from 2 to 8.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíle práce	8
3	Literární přehled	9
3.1	Řád brodiví	9
3.1.1	Čeď čápořití	10
3.1.2	Marabu africký	12
3.2	Partnerské vztahy a mimopárové chování ptáků	14
3.3	Repetitivní DNA	16
3.3.1	Rozptýlená repetitivní DNA	16
3.3.2	Tandemově repetitivní DNA	17
3.3.2.1	Satelity	17
3.3.2.2	Minisatelity	18
3.3.2.3	Mikrosatelity	18
3.4	Hledání nových mikrosatelitových lokusů	20
3.5	Analýza mikrosatelitových lokusů	21
3.5.1	Polymerázová řetězová reakce	21
3.5.2	Elektroforetická separace PCR produktů	22
3.5.3	Problémy při analýze PCR produktů	23
3.5.3.1	Nulové alely	23
3.5.3.2	Stutter bandy	24
3.5.3.3	Alelová homoplazie	24
4	Materiál a metody	25
4.1	Biologický materiál	25
4.2	Izolace genomické DNA pro PCR z ptačí krve	25
4.3	PCR amplifikace DNA	26
4.4	Zpracování PCR produktů	31
4.5	Použité chemikálie	33
4.6	Použité roztoky	34
4.7	Laboratorní přístroje	36
5	Výsledky	38
6	Diskuze	48
7	Závěr	53
8	Seznam zkratk	54
9	Použitá literatura	55

1 Úvod

Mikrosatelity patří mezi tandemově repetitivní DNA. Jejich repetitivní jednotka je tvořena 1–6 bp. Vyskytují se v kódujících i nekódujících oblastech genomu prokaryot a eukaryot. Pro mikrosatelity je typický vysoký polymorfismus, který je dán velkou rychlostí mutací. Jsou používány jako genetické markery např. při určování paternity, identifikaci jedinců, fylogenetických nebo populačně genetických studiích. Nové mikrosatelitové lokusy se získávají dvěma způsoby. Při *de novo* izolaci je nalezen mikrosatelitový lokus, pro který je vytvořen specifický pár primerů pro studovaný druh. *Cross-species* PCR amplifikace je zase metoda, která využívá PCR amplifikaci DNA studovaného druhu s primery, navrženými původně pro příbuzné druhy.

Ve své bakalářské práci se budu zabývat hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů u marabu afrického (*Leptoptilos crumeniferus*) pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace. Testovány budou všechny mikrosatelitové páry primerů, které jsou odvozeny od jednotlivých druhů z řádů brodiví (Ciconiiformes), potápky (Podicipediformes) a potáplice (Gaviiformes) a některé páry primerů, které jsou odvozeny od druhů z řádů dlouhokřídlí (Charadriiformes), vrubozobí (Anseriformes) a tučňáci (Sphenisciformes).

2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
3. PCR amplifikace DNA marabu afrického s využitím *cross-species* primerů pro mikrosatelity, které jsou známé v řádu brodivých.

3 Literární přehled

3.1 Řád brodiví

Řád brodiví (Ciconiiformes) je tvořen 3 čeleděmi: volavkovití (Ardeidae), ibisovití (Threskiornithidae) a čápoovití (Ciconidae). V rámci těchto čeledí lze nalézt kolem 115 druhů (Gaisler *et* Zima, 2007). Molekulární studie ukázaly příbuznost brodivých s kondory, kteří jsou řazeni do řádů dravců (Falconiformes) (Burnie, 2008). Kromě polárních oblastí lze brodivé nalézt po celém světě (Gaisler *et* Zima, 2007).

Mezi brodivé patří, co do velikosti, velmi rozmanité druhy. K nejmenším druhům patří bukáčci (*Ixobrychus*), kteří měří asi 30 cm a váží méně než 100 g. Naopak mezi největší se řadí čápi, kteří jsou až více než 1,2 m vysokí. Rozpětí křídel u některých druhů je až 2,6 m (Anonymous, 2012).

Většina brodivých se zdržuje u mělkých vod (Ramel, 1999). Některé druhy, např. čáp bílý (*Ciconia ciconia*), žijí většinu času na suché zemi (Anonymous, 2012). Pro získávání potravy z tohoto prostředí mají uzpůsobené tělo. Mají výrazně dlouhý zobák, dlouhý krk a dlouhé nohy. Nohy jsou brodivé s dobře vytvořených palcem (Gaisler *et* Zima, 2007). Na nohou jsou prsty, které jsou mezi sebou široce rozdělené. Mezi třemi předními prsty se nacházejí menší či větší plovací blány. Ty slouží k rozložení váhy při kráčení bahnem či mokřinami. Dlouhý zobák slouží k vytahování živočichů z vody či bahna. V rámci brodivých je možné se setkat s různými tvary zobáků. Ibisové mají dlouhý, tenký a směrem dolů zakřivený zobák. Volavky a čápi mají zobák rovný, zakončený špičkou. Kolpíci mají zploštělý zobák, který se na konci rozšiřuje do podoby lopatky (Burnie, 2002). Pohlaví se obvykle barevně neodlišují, jen samice bývají většinou menší. Mláďata často vypadají odlišně v porovnání s dospělci (Šťastný *et al.*, 1998)

Všichni brodiví jsou masožraví. Loví většinou ryby, žáby a jiné obojživelníky (Burnie, 2008). Někteří loví také malé savce, ptáky, plazy či bezobratlé (Anonymous, 2012). Výjimečně můžou být mrchožraví, např. marabu africký (*Leptoptilos crumeniferus*) (Gaisler *et* Zima, 2007). U brodivých lze nalézt více způsobů lovení kořisti. Volavky a bukáčci stojí i hodiny bez hnutí na jednom místě a čekají, až se kořist přiblíží na dosah a oni ji budou moci ulovit. Čápi hledají potravu na zemi. Jak kráčí

trávou, či bažinou, vyruší živočichy v ní schované a ty pak loví. Ibisové a kolpíci mají velmi citlivé zobáky, kterými loví kořist ve vodě (Burnie, 2008).

Mnoho zástupců brodivých je tichých a vydávají pouze skřehotavé zvuky. Někteří čápi vydávají klapavé zvuky zobákem. Oproti tomu některé volavky vydávají hlasité a drsné výkřiky (Anonymous, 2012).

Ačkoliv jsou brodiví často při lovu rozptýlení a loví sami, sdružují se do hnízdních společenstev (Anonymous, 2012). Hnízda jsou často postavená na stromech (Ramel, 1999). Některé druhy hnízdí také na skalách či budovách. Čáp bílý hnízdí také na uměle vytvořených plošinách, postavených pro něj (Anonymous, 2012). Celkem běžně lze vidět smíšené kolonie, ve kterých čápi, ibisové i volavky hnízdí spolu (Ramel, 1999). Naopak v některých případech je tvorba kolonií jen sezónní. Např. u čápa bílého jsou jedinci v době rozmnožování rozptýlení a kolonie utvářejí až při migraci (Anonymous, 2012).

U mnoha druhů lze pozorovat změnu barvy nohou a zobáku během období páření. Většina druhů tvoří páry. V období páření jsou typické namlouvací rituály (Ramel, 1999). Obvykle kladou 2–6 vajec do velkého, z větví tvořeného hnízda (Burnie, 2008). Mláďata jsou nidikolní a starají se o ně oba rodiče (Gaisler *et* Zima, 2007). Všeobecně je rodičovská péče spravedlivě rozdělena mezi pohlavími a to nejen v krmení mláďat, ale také při stavbě hnízda či vysezení mláďat (Anonymous, 2012). Brodiví jsou velmi dobří letci. Velké druhy pomalu mávají křídly a létají krouživým letem či plachtěním. Tímto způsobem jsou schopni uletět i velmi velké vzdálenosti (Burnie, 2008).

3.1.1 Čeled' čápovití

Čápovití (Ciconiidae) se rozdělují do třech tribů. Tribus *Mycterini* obsahuje rod *Mycteria* (4 druhy) a *Anastomus* (2 druhy). Jedinci jsou menší velikosti, žijí v koloniích a mají specializované zobáky z důvodu techniky lovu kořisti. Tribus *Ciconiini* tvoří sedm druhů z rodu *Ciconia*. Jsou to čápi, žijící buď samostatně nebo v koloniích. Jsou středně velcí. Zobáky mají univerzální, tudíž mohou užívat různé techniky lovu a různý druh kořisti. Do tribu *Leptoptilini* patří 2 druhy z rodu *Ephippiorhynchus*, 1 druh rodu *Jabiru* a 3 druhy rodu *Leptoptilos*. Jednotliví zástupci jsou velcí a mají masivní zobák, který je u některých specializovaný pro určitý typ potravy. Druhy z rodu *Leptoptilus*

téměř bez výjimky tvoří kolonie. Oproti tomu jedinci z rodu *Ephippiorhynchus* jsou obvykle samotáři (del Hoyo *et al.*, 1992).

Všeobecně patří čápovití mezi větší a těžší ptáky. Samec bývá obvykle o trochu větší než samice. Čápovití mají typicky velký zobák, jehož tvar je variabilní a spočívá v tom, jaký typ potravy jedinci vyhledávají. Dlouhý krk a dlouhé nohy jsou typické u všech druhů. Jsou využívány při lovu, kdy jedinci mohou snáze dopadnout kořist, která je dál nebo se jim snaží utéct (del Hoyo *et al.*, 1992). Čápovití mají dlouhá a široká křídla. Vynikajícím způsobem plachtí, často ve velkých výškách (Šťastný *et al.*, 1998). Při letu neudržují pravidelné formace. Létají s krky nataženými. Výjimkou je rod *Leptoptilos*, jehož zástupci při letu krk stáhnou, pravděpodobně kvůli svému velkému a těžkému zobáku. Mají krátký ocas a jejich dlouhé nohy během letu trčí za nimi. Zbarvení peří je většinou kombinací černé, tmavě šedé a bílé barvy. Pohlaví se od sebe zbarvením peří neliší. Mláďata se ovšem od rodičů mohou vzhledově výrazně lišit. Hodně času tráví čechráním peří (del Hoyo *et al.*, 1992)

Čápovití mají skoro kosmopolitní rozšíření. Jsou poměrně přizpůsobiví pokud jde o prostředí. Obvykle preferují pobyt v blízkosti vody. Některé rody jsou na dostatku vody přímo závislé. Jiné druhy ovšem dokáží žít i tam, kde je voda vzácná. Obvyklým prostředím, kde čápovití žijí, jsou močály, bažiny, řeky, jezera, rybníky, ale také lesy, savany či pole. Někteří zástupci jsou typicky vysoce společenští a tvoří kolonie. Mezi čápovitými se najdou ale i takové druhy, které jsou samotářské, zejména v období mimo rozmnožování. Špatně snáší extrémní počasí, ať už je to chlad a déšť anebo vysoké teploty. Jsou velmi tiší, ale nejsou němí. U některých rodů jsou běžné uvítací zvuky. Typickým a nejdůležitějším zvukem je klapání zobáku (del Hoyo *et al.*, 1992).

Dostupnost potravy je nejdůležitějším faktorem limitujícím čápovité ve všech aspektech jejich ekologie, včetně rozmístění, dlouhověkosti, reprodukční schopnosti a velikosti populace (del Hoyo *et al.*, 1992). Jsou to masožraví ptáci, kteří se živí drobnými savci, ptáky, plazy, obojživelníky, rybami a bezobratlými. Některé druhy jsou všestranné, jiné jsou zase specializované na určitý typ potravy (Ramel, 1999). Např. zejzob africký (*Anastomus lamelligerus*) má zobák přizpůsobený k lovu plžů (del Hoyo *et al.*, 1992).

Čápovití hnízdí většinou na stromech nebo na vyvýšených místech (Šťastný *et al.*, 1998). Tam si staví velká hnízda, která jsou obvykle z rostlinného materiálu. Čápovití jsou obvykle společensky monogamní. Mnoho druhů je ale geneticky promiskuitních a vyhledávají mimopárovou kopulaci. Některé druhy spolu v páru žijí

celý život, naopak jiné druhy pár utvoří jen v době rozmnožování v jedné sezóně (Ramel, 1999). V hnízdech kladou vejce, jichž je obvykle 3–5. Vejce jsou oválná a křídově bílá a inkubují se 25–38 dnů. Líhnutí mláďat je asynchronní. Mláďata jsou nidikolní a oba rodiče přinášejí svým věčně hladovým mláďatům potravu. V prvních několika týdnech mláďata spořádají enormní množství potravy (del Hoyo *et al.*, 1992).

Většina druhů žije stále v tropických oblastech. Některé rody však obývají i chladnější oblasti a na zimní období odlétají (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.2 Marabu africký

Taxonomické zařazení marabu afrického (*Leptoptilos crumeniferus*) (Muckley, 2001):

Říše: Živočichové (Animalia)

Kmen: Strunatci (Chordata)

Podkmen: Obratlovci (Vertebrata)

Třída: Ptáci (Aves)

Podtřída: Létaví (Neognathae)

Řád: Brodiví (Ciconiiformes)

Čeleď: Čápovití (Ciconiidae)

Tribus: *Leptoptilini*

Rod: Marabu (*Leptoptilos*)

Druh: Marabu africký (*Leptoptilos crumeniferus*)

Marabu africký, viz obrázek č. 1, je 115–152 cm velký. Samci jsou obvykle větší. Rozpětí jeho křídel je 225–287 cm. Jeho hmotnost je 4–8,9 kg (del Hoyo *et al.*, 1992). Průměrná délka života tohoto druhu ve volné přírodě je 25 let. V zajetí se dožívá až 41 let. Na zádech a křídlech má černá či tmavě šedá pera. Na břišní straně je bílý. Na krku ani na hlavě nemá peří. Z krku mu visí dlouhý, načervenalý vak, který používají při námluvách (Muckley, 2001).



Obr. č. 1: Marabu africký (*Leptoptilos crumeniferus*)

Zdroj: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Marabu africký, jak už z názvu druhu vyplývá, žije v Africe. Konkrétně jižně od Sahary (Burnie, 2002). Obývá suché savany, travní porosty, mokřady a břehy jezer. Méně častěji se vyskytuje v lese či na poušti. Jeho výskyt je typický okolo rybářských vesnic. Lze ho nalézt také na skládkách nebo jatkách. Je to mrchožrout a v Africe obvykle žije s dalšími mrchožrouty, jak ptačími, tak savčími (del Hoyo *et al.*, 1992).

Jelikož žije v blízkosti lidských obydlí, může se živit kousky ryb a odpadky pocházejícími od lidí (del Hoyo *et al.*, 1992). Jeho velký zobák mu slouží k odtrhávání masa z mršiny. Adaptací na tento způsob příjmu potravy je téměř lysý krk a hlava. Díky této adaptaci nedojde k znečištění peří při příjmu potravy (Burnie, 2002). Ovšem marabu se neživí jen mršinami. V jeho jídelníčku jsou ryby, kobyly, žáby, ještěrky, krysy, myši, hadi nebo ptáci. Je schopen ulovit mladé, ale i dospělé plameňáky (del Hoyo *et al.*, 1992).

Žije v koloniích, které čítají od 20–60 párů až k několika tisícům. Často žije společně s jinými druhy, hlavně patřícími do řádu brodivých. Obvykle hnízdí na stromech ve výšce 10–30 m. Žije ale také i na útesech a dokonce i na ulicích měst.

Jeho hnízdo je tvořeno větvičkami a listy. Je asi 1 m široké a 30 cm hluboké (del Hoyo *et al.*, 1992). Je obvykle tichý, ale občas vydává vrčivé zvuky, či hlasité zvuky klapáním zobáku. Při námluvách vydává zvuky pomocí svého vaku na krku. Většinou tvoří páry, které jsou spolu celý život (Muckley, 2001). Obvykle klade 2–3 vejce. Ta se inkubují 29–31 dnů (del Hoyo *et al.*, 1992). Mláďata jsou vychovávána v období sucha. V tomto období je hladina vody nízká a to usnadňuje chytání žab a ryb, kterými krmí mláďata. Pohlavní dospělosti dosahuje čtvrtým rokem (Muckley, 2001).

Díky variabilnímu způsobu obživy není marabu africký na seznamu ohrožených druhů. Naopak početnost druhu se zvyšuje (Burnie, 2002).

3.2 Partnerské vztahy a mimopárové chování ptáků

U ptáků lze pozorovat tři druhy partnerských vztahů. Ekologické podmínky, délka hnízdní doby a potravní nabídka rozhodují o typu partnerského vztahu. Nejčastěji se vyskytuje monogamie a to u 90 % ptačích druhů. Monogamie je vztah jednoho samce a jedné samice. Při sezení na vejcích, zahřívání, krmení a výchově mláďat jsou povinnosti rozděleny mezi oba partnery. Některé páry spolu mohou vydržet po celý život. Druhým typem ptačích svazků je polygamie. Jedná se o svazek, který se skládá z více samců či samic. Toto lze pozorovat asi u 3 % ptačích druhů. Rozlišují se 3 typy polygamie. Polygynie je situace, kdy se samec páří s více samicemi. Opačnou situaci je polyandrie, kdy se samice páří s více samci. Pokud vznikne skupina samců a samic, kteří se mezi sebou vzájemně páří, nazýváme tento svazek polygynandrií neboli kooperativní polyandrií. Třetím typem partnerského vztahu je promiskuita. To je stav, kdy se samec bez jakýchkoliv závazků páří s kteroukoliv samicí. O mláďata se poté stará samice sama (Veselovský, 2005).

Až do osmdesátých let minulého století se mělo zato, že u monogamních párů je samec z tohoto páru biologickým otcem všech mláďat (Veselovský, 2005). Díky molekulárním metodám se zjistilo, že se u sociálně monogamních ptáků často objevuje určitý stupeň mimopárové kopulace (*extra-pair copulations* - EPC) a mimopárového oplodnění (*extra-pair fertilization* - EPF) (Wink *et Dyrce*, 1999). Pravá monogamie, jak sociální, tak genetická byla nalezena u méně než 25 % monogamních druhů (Griffith *et al.*, 2002). Např. u buňáka ledního (*Fulmarus glacialis*) se mimopárová paternita (EPP) vyskytuje ve velmi nízkých frekvencích

nebo úplně chybí (Petrie *et* Kempenaers, 1998). U ostatních druhů byla ve větší či menší míře u mlád'at zjištěna mimopárová paternita (*extra-pair paternity* – EPP) (Griffith *et al.*, 2002). Frekvence výskytu mimopárové paternity (EPP) se může lišit mezi jednotlivými druhy stejného rodu. U rákosníka ostřicového (*Acrocephalus paludicola*) se mimopárová paternita vyskytuje u 36 % mlád'at. Zato rákosník velký (*Acrocephalus arundinaceus*) má asi jen 3,4 % mimopárových mlád'at. Rozdíly ve frekvenci mimopárové paternity lze nalézt také v různých populacích stejného druhu. V jednotlivých populacích budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*) je frekvence mimopárové paternity mezi 0–50 % (Petrie *et* Kempenaers, 1998).

Mimopárová kopulace (EPC) je pro zdatné samce šancí, jak zvýšit rozmnožovací úspěšnost. Tím, že zplodí více mlád'at, která budou rozmístěna ve více hnízdech, zvyšují šanci na přežití těchto mlád'at a předání svých genů. Při hledání samičky pro mimopárovou kopulaci se sameček vzdálí od hnízda. Opuštěná samice tak může být oplodněna jiným samečkem. Aby k tomu nedošlo a sameček měl jistotu, že všechna mlád'ata v hnízdě jsou jeho biologickými potomky, vyvinuly se u samečků dvě strategie. Buď se sameček zdržuje poblíž hnízda a odhání ostatní samce v době, kdy je samička schopna oplození. Nebo u druhů, u kterých jsou obě pohlaví zbarvena stejně, samec nabádá druhé samce k páření, a tím druhého samce zbaví na čas spermií (Veselovský, 2005).

Samičky obvykle hledají „dobré geny“, které by se přenesly na potomky. Pokud je v populaci velká variabilita v kvalitě mezi samci, tak je relativně málo tzv. „dobrých samců“ a frekvence mimopárové paternity je větší. V populacích, u kterých je menší genetická variabilita, je také menší frekvence mimopárové paternity. Příkladem jsou geograficky izolované populace (např. ostrovy). U ostrovní populace vrabce domácího (*Passer domesticus*) bylo zjištěno 1 % mimopárových mlád'at, ale u pevninské populace to bylo 13,6 % mimopárových mlád'at. Samičky také vyhledávají mimopárovou kopulaci, aby si zajistily potomky v případě ztráty partnera, např. v populacích s vysokou úmrtností (Petrie *et* Kempenaers, 1998). Výhodou mimopárové kopulace je také to, že při neplodnosti vlastního samce ho nahradí jiný samec. Pro samičku je také přínosem, že získá dalšího samce, který bude pomáhat při výchově mlád'at (Veselovský, 2005).

3.3 Repetitivní DNA

Většina DNA genomu prokaryot kóduje proteiny (Campbell *et* Reese, 2006). Na rozdíl od prokaryot, genom eukaryot obsahuje velké množství nekódujících sekvencí (Šeda *et al.*, 2005). Některé z těchto nekódujících sekvencí jsou regulující sekvence. Introny jsou příkladem nekódující sekvence DNA, která může přerušovat kódující sekvenci eukaryotického genu. Velkou část nekódující DNA tvoří repetitivní DNA, jež se nenachází uvnitř genu, jako je to u intronů (Campbell *et* Reese, 2006). Repetitivní DNA obsahuje sekvence, které se mnohokrát opakují (Šeda *et al.*, 2005). Dělí se do dvou skupin, dle toho, zda se repetitivní sekvence vyskytují v genomu jednotlivě rozptýleny nebo jsou-li seskupeny (Bennett, 2000).

3.3.1 Rozptýlená repetitivní DNA

Jednotlivé úseky rozptýlené repetitivní DNA se nacházejí rozprostřeny po celém genomu eukaryotického organismu. Délka jednotky rozptýlené repetitivní DNA má velikost 100–1000 párů bází a tvoří mnoho kopií. Tyto kopie jsou si podobné, ne však identické, a jsou rozprostřeny po celém genomu. 25–40 % savčího genomu je tvořeno rozptýlenou repetitivní DNA (Campbell *et* Reece, 2006).

Transpozony neboli mobilní genetické elementy jsou úseky DNA, které jsou schopné se pohybovat v genomu z jednoho místa na druhé (Campbell *et* Reece, 2006). Tento přesun transpononu je uskutečňován pomocí enzymu transponáza (Šeda *et al.*, 2005).

Retrotranspozony tvoří velkou část lidského genomu. Aby se retrotranspozony mohly přemístit, je zapotřebí RNA polymeráza, která sekvenci přepíše do RNA. RNA je poté pomocí reverzní transkriptázy převedena zpět na DNA a vložena do genomu (Šeda *et al.*, 2005).

Podle délky lze rozlišit dva typy rozptýlených repetitivních elementů (Bennett, 2000). SINEs (*short interspersed nuclear elements*) jsou krátké rozptýlené jaderné elementy kratší než 500 bp (Šeda *et al.*, 2005). Známou sekvencí patřící mezi SINEs jsou Alu repetice, které jsou přibližně 280 bp dlouhé (Bennett, 2000). Alu elementy mají více než milión kopií a tvoří 11 % lidského genomu (Šeda *et al.*, 2005). Druhým typem rozptýlených repetitivních elementů jsou LINEs (*long interspersed nuclear elements*), dlouhé rozptýlené jaderné

elementy (Bennett, 2000). Nejdůležitějším transpozonem patřícím do LINEs je L1. L1 má asi 600 bp a v lidském genomu se opakuje 3000–5000 krát (Snustad *et* Simmons, 2009).

3.3.2 Tandemově repetitivní DNA

Tandemové repetice se skládají ze stejných či téměř stejných opakujících se sekvencí (Šeda *et al.*, 2005). Repetice s velkým počtem kopií nekódují žádný protein a nepodléhají transkripci. Sekvence s menším počtem repetic kódují proteiny, kterých je v organismu potřeba velké množství, např. ribozomální proteiny nebo aktin a myozin (Snustad *et* Simmons, 2009). Přes 10 % lidského genomu tvoří tandemové repetice (Benson, 1999). Konzervativní nukleotidové sekvence lze nalézt u centromer a telomer (Grady *et al.*, 1992). Nárůst počtu trinukleotidových repetit z desítek až na stovky či tisíce je spojen s mnoha chorobami. Mezi tyto choroby patří Huntingtonova choroba, syndrom fragilního X, myotická dystrofie, spinální muskulární atrofie či Friedreichova ataxie (Benson, 1999). Dle délky opakujících se sekvencí se tandemové repetice rozdělují na satelity, minisatelity a mikrosatelity (Campbell *et* Reece, 2006).

3.3.2.1 Satelity

Satelitní DNA obsahuje repetitivní jednotku dlouhou obvykle asi 300 bp (Tautz, 1993). Ovšem někdy tato repetitivní sekvence může být dlouhá až několik Mb (Bennett, 2000). Počet kopií se pohybuje mezi tisíci až deseti milióny. (Tautz, 1993). Satelitní DNA v lidském genomu není přepisována do RNA a nachází se v heterochromatinu (Bennett, 2000). Satelity se ve velkém množství vyskytují v centromerách a telomerách (Campbell *et* Reece, 2006).

3.3.2.2 Minisatelity

Velikost repetitivní sekvence minisatelitů je 6–100 bp. Délka minisatelitů se pohybuje mezi 0,5 až několika kb (Vergnaud, 2000). Rozlišují se dva typy minisatelitů (Bennett, 2000).

Bennett (2000) uvádí, že telomerické minisatelity obsahují 10–15 kb opakujících se hexanukleotidových sekvencí (u obratlovců hlavně TTAGGG). Přidávání těchto sekvencí je možné pomocí enzymu telomerázy (Šeda *et al.*, 2005). Telomery brání odbourávání konce molekul DNA, brání fúzím s jinými molekulami DNA a umožňují replikaci DNA bez ztrát genetického materiálu. Ve většině buněk dochází při stárnutí ke zkracování celkové délky repetice (Snustad *et Simmons*, 2009).

U variabilních minisatelitů se délka základní jednotky pohybuje od 6 až po více než 50 nukleotidů. Velikost minisatelitů vykazuje mezi jednotlivci velký polymorfismus (Bennett, 2000). Díky těmto rozdílům v počtu repetice se tyto minisatelity označují jako VNTRs (*variable number of tandem repeats*) (Ramel, 1997). Minisatelity obsahují konzervativní sekvenci, bohatou na guanin. Vlastní minisatelit je z obou stran obklopen sekvencemi DNA, jež se mezi jednotlivými lokusy liší. Mutační rychlost je u minisatelitů obrovská a heterozygotnost v populaci může být u některých minisatelitů větší než 99 %. Minisatelitů se využívá k DNA fingerprintingu (Zima *et al.*, 2004).

3.3.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou tvořeny základní repetitivní jednotkou o velikosti 1–6 bp (Tóth *et al.*, 2000, Buschiazzo *et Gemmell*, 2006, Chistiakov *et al.*, 2006). Počet mikrosatelitových repetic se obvykle pohybuje mezi několika desítkami až ke stovce (Bennett, 2009). Kvůli své struktuře a tandemovému uspořádání se mohou mikrosatelity označovat jako krátké tandemové repetice – STRs (*short tandem repeats*) nebo repetice jednoduchých sekvencí – SSRs (*simple sequence repeats*) (Zima *et al.*, 2004). Mikrosatelity lze nalézt v kódujících i nekódujících oblastech genomu prokaryot i eukaryot (Tóth *et al.*, 2000, Zane, 2002, Buschiazzo *et Gemmell*, 2006).

Mikrosatelity lze rozdělit na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové (Tóth *et al.*, 2000, Ellengren, 2004). U obratlovců mají mononukleotidové mikrosatelity

zastoupení 16,5 % (Chistiakov *et al.*, 2006). Výrazně převažuje repetice A/T nad G/C (Tóth *et al.*, 2000). Většina mikrosatelitů (30–67 %) je tvořena dinukleotidovými repeticemi. V genomu obratlovců je nejčastěji se opakující dinukleotidový motiv AC. Druhým nejčastějším motivem je AT. Trinukleotidové mikrosatelity tvoří 19 % všech mikrosatelitů (Chistiakov *et al.*, 2006). Nejčastější jsou repetitivní jednotky bohaté na G+C (např. CCG, CGG, GCC) (Tóth *et al.*, 2000). Nárůst počtu kopií těchto trinukleotidových mikrosatelitů může vést k výše uvedeným nemocem. Tetranukleotidové repetice tvoří 21 % (Chistiakov *et al.*, 2006). Nejčastěji je tvoří repetice bohaté na G+C. U savců lze také nalézt vysoké zastoupení AAGG, AAAT a AAAG. Tyto mikrosatelity se prakticky nevyskytují v exonech (Tóth *et al.*, 2000). Pentanukleotidové mikrosatelity jsou nejméně početnou skupinou mikrosatelitů (3 %) (Chistiakov *et al.*, 2006). Převažují jednotky bohaté na A+T (např. AAAAC či AAAAT) (Tóth *et al.*, 2000). Hexanukleotidové repetice představují 6 % mikrosatelitů (Chistiakov *et al.*, 2006).

Mikrosatelity lze také rozdělit na dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené. Dokonalé mikrosatelity jsou tvořeny nepřerušovaným řetězcem repetitivních jednotek (TATATATATATATA). U nedokonalých mikrosatelitů se v řetězci nukleotidů nachází báze navíc, která řetězec přerušuje (TATATATACTATATA). Pokud se v repetitivních jednotkách objeví krátký úsek odlišných nukleotidů, jde o přerušovaný mikrosatelit (TATATACGTGTATATATA). Složený mikrosatelit je tvořen dvěma sousedními repetitivními sekvencemi (TATATATATAGTGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

Existují dvě teorie vzniku mikrosatelitů. První říká, že mikrosatelity vznikly spontánně z jedinečných sekvencí (*de novo* mikrosatelity). Mezistupněm mezi jedinečnou sekvencí a mikrosatelitem se stal proto-mikrosatelit. Ten obsahuje 3–4 repetitivní jednotky. První teorie byla, že proto-mikrosatelity vznikly substitucí v původní sekvenci a poté byly dále rozšiřovány. Dnes se má za to, že proto-mikrosatelity vznikly inzercí v primární sekvenci a zkopírováním okolních bází. Druhou teorií je vznik adoptivních mikrosatelitů, které vznikly přijetím sekvencí z jiných míst genomu prostřednictvím transpozónů (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006).

Polymorfismus mikrosatelitů je dán hlavně jejich délkou a ne primární sekvencí (Ellegren, 2004). Je to dáno velkou mutační rychlostí mikrosatelitů (10^{-2} – 10^{-6}). K mutacím dochází dvěma mechanismy – sklouznutím DNA polymerázy a interchromozomální výměnou (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006). Při sklouznutí DNA

polymerázy dochází buď na mateřském nebo na dceřiném vlákně ke vzniku smyčky (Bennett, 2000). Pokud ke vzniku smyčky dojde na dceřiném vlákně, počet repetice se zvýší. Pokud ale smyčka vznikne na mateřském vlákně, dojde ke snížení počtu repetice (Oliveira *et al.*, 2006). Většina chyb způsobených vznikem smyček je však odhalena a opravena pomocí reparačního systému (Bennett, 2000). Při interchromozomální výměně dochází k rekombinaci nebo nerovnoměrnému crossing-overu (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006). Při nerovnoměrném crossing-overu dochází ke ztrátám repetice na jenom chromozómu a získání repetice na druhém homologním chromozómu (Oliveira *et al.*, 2006).

Mikrosatelity se vyznačují velkým polymorfizmem, kodominantní dědičností, krátkou délkou a rozsáhlým pokrytím genomu. Jsou používány při genetickém mapování, ke stanovení paternity, identifikaci jedinců, při fylogenetických studiích, v populační genetice nebo při sledování molekulárně-patologických projevů některých chorob (Chistiakov *et al.*, 2006).

3.4 Hledání nových mikrosatelitových lokusů

Mikrosatelity jsou velmi často používané jako genetické markery. Problémem ale je, že neexistují univerzální primery, které by se daly použít na všechny biologické druhy (Primmer *et al.*, 2005). Existují dva způsoby, jak získat mikrosatelitové páry primerů. Buď se vytvoří druhově specifický pár primerů pomocí *de novo* izolace. Tento způsob je ovšem drahý a časově náročný. Druhý způsob je *cross-species* PCR amplifikace na příbuzných druzích (Galbusera *et al.*, 2000).

Při *de novo* izolaci mikrosatelitových primerů je nejdříve izolována DNA, která je poté fragmentována pomocí restričních enzymů nebo, méně častěji, pomocí ultrazvuku. Z různě dlouhých fragmentů jsou následně vybírány fragmenty o velikosti 300–700 bp. Podle metody zvolené fragmentace jsou vybrané fragmenty vloženy do plazmidového vektoru, buď přímo nebo pomocí specifického adaptoru. Vektory jsou poté transformovány do bakteriální buňky a mohou tak vzniknout tisíce rekombinovaných klonů. U klonů se poté zjišťuje, zda obsahují mikrosatelitovou sekvenci. To se provádí pomocí Southern blottingu na nylonovou membránu a poté hybridizací se značenou sondou. Klony, které obsahují mikrosatelitovou sekvenci jsou použity k návrhu primerů (Zane *et al.*, 2002).

Metoda *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových primerů je založena na tom, že mikrosatelitové primery, izolované z určitého druhu, mohou amplifikovat DNA příbuzných druhů. Jelikož dochází k akumulování mutací v sekvencích navazujících na mikrosatelity, velkou roli v *cross-species* amplifikaci hraje fylogenetická vzdálenost. U ptáků byla první studie prováděna s primery navrženými pro vlaštovku obecnou (*Hirundo rustica*) a lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*). *Cross-species* PCR amplifikace s těmito primery byla prováděna na devatenácti ptačích druzích, nepatřících mezi pěvce, ze čtrnácti čeledí a dvaceti devíti druzích pěvců z osmi čeledí. Studie ukázala, že čím větší je fylogenetická vzdálenost mezi druhy, tím nižší je úspěšnost PCR amplifikace mikrosatelitových primerů poskytují polymorfní produkt (Primmer *et al.*, 1996).

3.5 Analýza mikrosatelitových lokusů

Princip analýzy mikrosatelitů je v celku jednoduchý. Pokud jsou známy sekvence primerů, které na mikrosatelit navazují, provede se polymerázová řetězová reakce (PCR). Produkt PCR reakce je poté separován dle délky pomocí elektroforézy (Zima *et al.*, 2004).

3.5.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR, *polymerase chain reaction*) byla objevena v roce 1985 Kary B. Mullisem a znamenala obrovský přínos pro molekulární biologii (Šmarda *et al.*, 2005). PCR je technika, kterou lze amplifikovat *in vitro* určitý specifický úsek DNA. Množství původní DNA přitom může být velmi malé, teoreticky by stačila jediná molekula DNA. Výsledný produkt obvykle není nutné purifikovat, protože obsahuje téměř výhradně délkově definovanou sekvenci (Zima *et al.*, 2004).

Pro správné proběhnutí PCR reakce je třeba mít molekulu DNA, jejíž část má být amplifikována. Úsek nukleotidové sekvence, který má být amplifikován, je ohraničen připojením dvou primerů. Primery se váží na protilehlé řetězce tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Délka primerů je obvykle 18–25 nukleotidů, oblasti bohaté na G/C a A/T páry jsou rovnoměrně distribuovány, obsah G+C je 40–60 %. Při návrhu primerů je důležité, aby sekvence primerů byla v genomu

jedinečná a specificky se vázala jen k jedinému místu (Šmarda *et al.*, 2005). K syntéze nového vlákna je potřeba enzym DNA polymeráza. Dříve se při tepelné denaturaci DNA denaturovala také DNA polymeráza a do každého cyklu se tak musel enzym znovu přidávat (Zima *et al.*, 2004). Později se začala používat *Taq* polymeráza. Ta byla izolována z bakterie *Thermus aquaticus*. Tato bakterie žije v horkých pramenech a řada jejích enzymů včetně *Taq* polymerázy je termostabilní, tudíž při zvýšení teploty nedojde k její denaturaci (Brown, 2007). Reakční směs musí ještě obsahovat všechny čtyři nukleotidy, pufr, $MgCl_2$ a kvalitní redestilovanou vodu (Zima *et al.*, 2004).

Vlastní PCR reakce probíhá ve třech krocích. Prvním krokem je denaturace, při které se směs zahřeje na teplotu 92–95 °C a dojde tak k disociaci fragmentů dsDNA na jednotlivé řetězce. Poté se směs zchladí a naváží se primery (*annealing*). Při tomto kroku se teplota pohybuje mezi 42–60 °C. Extenze je třetím krokem PCR reakce, při níž dojde k syntéze nových řetězců, která probíhá ve směru 5'→3' od navázaného primeru a je katalyzována enzymem *Taq* polymerázou. Teplota při extenzi se pohybuje mezi 70–75 °C, nejčastěji však probíhá při 72 °C. Délka tohoto kroku závisí na velikosti syntetizovaného fragmentu (Zima *et al.*, 2004).

Jednotlivé kroky PCR reakce se cyklicky opakují. Obvyklý počet cyklů se pohybuje mezi 25–35 cykly. PCR reakce je prováděna v přístroji zvaném termocykler, ve kterém se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Opakováním těchto kroků vzrůstá exponenciálně počet kopií, primery ohraničeného úseku DNA (Šmarda *et al.*, 2005)

3.5.2 Elektroforetická separace PCR produktů

Pro analýzu PCR produktů se nejčastěji používá elektroforetická separace. Principem této techniky je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Nukleové kyseliny nesou negativně nabitě fosfátové skupiny a tudíž se v elektrickém poli pohybují ke kladně nabitě anodě (Šmarda *et al.*, 2005).

Elektroforéza se provádí ve vhodném nosiči, což bývá nejčastěji gel. Gely pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji polyakrylamidové nebo agarózové (Šmarda *et al.*, 2005). Gely vytváří pórovitou strukturu, kterou musí molekuly DNA, při svém pohybu k anodě, projít. Dojde k separaci molekul DNA podle velikosti, jelikož menší molekuly DNA se v gelu pohybují rychleji. Pro separaci molekul

o velikosti 1–30 kb se používají agarózové gely. Pro menší molekuly v rozmezí 1–300 bp se používají polyakrylamidové gely (Brown, 2007).

Po dokončení elektroforézy se nejdříve musí molekuly DNA zviditelnit, aby se daly vyhodnotit. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou na gelu viditelné v podobě proužků, přičemž jejich intenzita je úměrná koncentraci DNA. Vizualizace se provádí pomocí ethidiumbromidu, dusičnanu stříbrného, fluorescenčních barviv např. SYBR Green nebo v případě radioaktivně značených molekul DNA autoradiograficky (Šmarda *et al.*, 2005).

3.5.3 Problémy při analýze PCR produktů

Hodnocení výsledků PCR amplifikace na gelu může být někdy problematické. Výskyt nulových alel, *stutter* bandů a homoplazie alel komplikuje analýzu PCR produktů.

3.5.3.1 Nulové alely

Nulové alely jsou mikrosatelitové alely, které nelze amplifikovat pomocí PCR a poté je tedy nelze ani identifikovat v gelu (Dakin *et* Avise, 2004). Nulové alely jsou důležité při genetických analýzách, kdy by mohlo dojít k chybnému vyhodnocení výsledků. Heterozygot nesoucí nulovou alelu by mohl být vyhodnocen jako homozygot (Jones *et* Ardren, 2003). Nulové alely byly nalezeny v mnoha organizmech např. u lidí, dvoukřídlých (Diptera), motýlů (Lepidoptera), měkkýšů (Mollusca), ale i u dřevin jako je borovice (*Pinus*), smrk (*Picea*) či jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*) (Chapuis *et* Estoup, 2007; Chybicki *et* Burczyk, 2009).

Nulové alely mohou vzniknout mutací v místech, která těsně přiléhají k mikrosatelitové sekvenci. V těchto místech nasedá primer. Pokud dojde k mutaci, primer nemůže nasednout a tudíž nedojde ani k amplifikaci. Ke vzniku nulové alely také dochází při PCR reakci, jelikož při PCR reakci nedochází k amplifikaci dvou různých alel stejně. Kratší alely se amplifikují efektivněji než delší alely. To může vést k tomu, že je u heterozygota detekována pouze kratší alela. Pro detekci delší alely je třeba zvýšit koncentraci templátové DNA nebo upravit kontrast. Třetí možností vzniku

nulových alel je nesprávně proběhnutí PCR při špatné kvalitě DNA nebo její nízké koncentraci (Dakin *et al.*, 2004).

3.5.3.2 Stutter bandy

Při vizualizaci výsledků PCR pomocí elektroforézy se na gelu mohou objevit bandy, které se od hlavního bandu liší velikostí. Tyto bandy se nazývají *stutter* bandy (*shadow* bandy, *DNA polymerase slippage product*) (Walsh *et al.*, 1996). Při amplifikaci repetitivní sekvence může dojít ke skluzu *Taq* polymerázy. Tak vzniknou *stutter* bandy, což jsou produkty PCR amplifikace, které jsou o jeden či dvě repetitivní jednotky kratší, než původní repetitivní sekvence. *Stutter* bandy se nejčastěji vyskytují u repetit, ve kterých je základní repetitivní jednotka dinukleotid. Méně častěji se vyskytují u repetit s tri- či tetranuklotidovou repetitivní jednotkou (Daniels *et al.*, 1998). V případě dinukleotidových repetit, je velikost *stutter* bandů nejčastěji o dvě báze menší, než je velikost hlavního bandu. Lze však ale nalézt i bandy menší o čtyři, šest či více bází. Při výskytu *stutter* bandů může dojít k problémům při vyhodnocování výsledků. Např. u heterozygota, jenž má alely podobné velikosti může dojít k tomu, že *stutter* bandy jedné alely splynou s hlavním bandem druhé alely (Walsh *et al.*, 1996).

3.5.3.3 Alelová homoplazie

Alelovou homoplazií se rozumí stav, kdy alely jednoho lokusu jsou shodné co se týče délky, ovšem jsou odlišné původem. Tato homoplazie vzniká mutací, při které mohou vznikat nové alely (Estoup *et al.*, 2002). Alelové homoplazie lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří alely, které mají stejnou délku, ale nemají stejnou sekvenci. Při elektroforetické separaci alely tedy nelze rozlišit, ale při sekvenaci ano. Do druhé skupiny patří alely, které mají délku i sekvenci identickou, ale mají odlišnou evoluční historii. Tyto alely lze zjistit pouze díky dříve zaznamenaným mutacím (Anmarkrud *et al.*, 2008).

Alelové homoplazie mohou představovat problém při vyhodnocení výsledků populačních a fylogenetických studií (Estoup *et al.*, 2002).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Genomická DNA, která byla použita pro mou bakalářskou práci, byla vyizolována z krve šesti nepříbuzných jedinců druhu marabu africký (*Leptoptilos crumeniferus*). Krev byla odebrána těmto jedincům v ZOO Dvůr Králové nad Labem.

4.2 Izolace genomické DNA pro PCR z ptačí krve

Tento postup byl převzat podle Maniatis *et al.* (1982) a byl upraven pro materiální a technické podmínky Laboratoře populační genetiky na Přírodovědecké fakultě UP.

- 1) Do mikrozkušavky bylo napipetováno 400 μ l roztoku ptačí krve v Queen's pufru.
- 2) Poté bylo připipetováno 100 μ l roztoku proteinázy K (10 mg/ml), promícháno překlápěním a přidáno 100 μ l 10% roztoku SDS.
- 3) Za překlápění v termostatu při 37 °C se mikrozkušavky inkubovaly do druhého dne.
- 4) Po přidání 350 μ l fenolu a 350 μ l chloroformu byly mikrozkušavky vortexovány a zcentrifugovány (2000 g / 5 min). Poté byla vrchní fáze odebrána uštíženou špičkou do nové mikrozkušavky.
- 5) K odebranému vzorku bylo přidáno 700 μ l chloroformu a mikrozkušavka byla zvortexována a zcentrifugována (2000 g / 5 min). Vrchní fáze byla odebrána do nové mikrozkušavky, ve které byl tento krok zopakován.
- 6) K odebranému roztoku bylo přidáno 180 μ l vychlazeného octanu sodného o koncentraci 3 mol/l a objem mikrozkušavky byl doplněn vychlazeným 96% ethanolem. Mikrozkušavky byly pomocí překlápění promíchány a uloženy na 2 hodiny do -20 °C.
- 7) Mikrozkušavky byly centrifugovány 30 minut při 13000 g.
- 8) Ethanol byl opatrně slit a k sraženině DNA byl přidán 1 ml vychlazeného 70% ethanolu.

- 9) Mikrozkušavky byly centrifugovány 10 minut při 13000 g.
- 10) Opět byl ethanol opatrně slit a mikrozkušavky se sraženinou DNA byly vysušeny v termobloku.
- 11) K vysušené DNA bylo přidáno 500 μ l TE pufru.
- 12) DNA v TE pufru byla za překlápění rozpouštěna přes noc v termostatu při 40 °C.
- 13) Po fluorometrickém stanovení koncentrace byla mikrozkušavka s roztokem DNA zamrazena v -20 °C. Část byla pro použití při PCR odebrána a naředěna deionizovanou vodou na koncentraci 10–50 μ g/ml a uchována v lednici.

4.3 PCR amplifikace DNA

Vyizolovaná genomická DNA byla amplifikována vybraným párem primerů, které byly obsaženy v PCR mixu, viz tabulka č. 1.

Tabulka č. 1: Složení PCR mixu pro 6 vzorků.

Složky PCR mixu	Objem (μ l)
Deionizovaná voda	44,4; 46,4*
Storage Buffer 10 x	6,7
MgCl ₂ (25 mmol/l)	4,0; 2,0*
dNTPs (20 μ mol/l)	0,7
primer F (10 μ mol/l)	3,3
primer R (10 μ mol/l)	3,3
<i>a Taq</i> DNA polymeráza (5 U/ μ l)	1,0

* pro PCR amplifikaci mikrosatelitového lokusu Cc02 byla použita poloviční koncentrace MgCl₂ a PCR mix byl doplněn o úměrný objem deionizované vody

Po rozmražení byly jednotlivé složky PCR mixu zvortexovány a též zcentrifugovány. Po napipetování složek do 1,5 ml mikrozkušavek, byly tyto mikrozkušavky zvortexovány a zcentrifugovány.

Do PCR zkušavek (stripů) byl napipetován 1 μ l genomické DNA naředěné na koncentraci 10–50 μ g/ml. Ke každému z šesti vzorků DNA bylo přidáno 9 μ l PCR mixu.

PCR zkumavky byly poté zcentrifugovány a umístěny do termocykléru. Časový a teplotní profil PCR reakce byl následující:

5 min.....	94 °C	} 35 cyklů
30 s.....	94 °C	
30 s.....	zvolená teplota <i>annealingu</i>	
30 s.....	72 °C	
7 min.....	72 °C	

Jako základní teplota *annealingu* byla zvolena teplota 50 °C. Na tuto teplotu byly otestovány všechny mikrosatelitové primery. Pro mikrosatelitové primery, u kterých se zdály být výsledky PCR amplifikace polymorfní, byla upravena teplota *annealingu* následující PCR reakce.

PCR amplifikace byla provedena s celkem 187 páry mikrosatelitových primerů. Jelikož byla použita metoda *cross-species* PCR amplifikace, primery nebyly navrženy primárně pro marabu afrického (*Leptoptilos crumeniferus*). Hlavním testovaným řádem byl řád brodiví (Ciconiiformes). Z toho řádu byly testovány všechny existující páry primerů. Marabu africký patří do řádu brodiví a při použití párů primerů navržených pro fylogeneticky blízké druhy byla nejvyšší šance na nalezení polymorfních mikrosatelitových lokusů. Celkem bylo testováno 157 párů primerů, které byly navrženy pro 11 druhů z řádu brodivých. Testovány byly dále řady potápky (Podicipediformes) a potáplice (Gaviiformes), u kterých byly též testovány všechny dosud známé mikrosatelitové páry primerů, dále dva primerové páry navržené pro jeden druh z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), jeden pár primerů pocházející od jednoho druhu z řádu tučňáci (Sphenisciformes) a několik primerových párů izolovaných z DNA 4 druhů z řádu vrubozobí (Anseriformes). Přehled jednotlivých mikrosatelitových lokusů, testovaných u marabu afrického je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Přehled mikrosatelitových lokusů testovaných u marabu afrického. V tabulce je dále uvedeno zařazení do řádu, zdrojových druh, autor a rok publikace.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitové lokusy	Literární zdroj
Brodiví (Ciconiiformes)	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	Segelbacher, osobní sdělení
	Čáp východní (<i>Ciconia boyciana</i>)	Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168, Cbo235	Wang <i>et al.</i> , 2011
	Ibis japonský (<i>Nipponia nippon</i>)	NnAF4, NnBF7, NnCE11, NnCG3, NnDD9, NnEB12, NnHB12, NnNF5, NnEA9, NnAD10, NnEH10, NnGF4, NnLF11	Ji <i>et al.</i> , 2004
		Nn01, Nn03, Nn04, Nn12, Nn16, Nn17, Nn18, Nn21, Nn23, Nn25, Nn26	He <i>et al.</i> , 2006
	Ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Eru02, Eru03, Eru04, Eru05, Eru06, Eru07, Eru08, Eru09, Eru10, Eru11	Santos <i>et al.</i> , 2006
	Kolpík malý (<i>Platalea minor</i>)	PM1-4, PM1-13, PM1-17, PM2-14, 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, PM3-28, PM3-29, PM3-31	Yeung <i>et al.</i> , 2009

Tabulka č. 2 – pokračování.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitové lokusy	Literární zdroj
Brodiví (Ciconiiformes)	Kolpík růžový (<i>Ajaia ajaja</i>)	Aaju1, Aaju2, Aaju3, Aaju4, Aaju5, Aaju6	Sawyer <i>et al.</i> Benjamin, 2006
	Kvakoš noční (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	nycti14, nycti15, nycti22, nycti26, nycti35, nycti36, nycti41, nycti43, nycti62, nycti68, nycti74	Chang <i>et al.</i> , 2009
	Nesyt lesní (<i>Mycteria americana</i>)	W μ 03, W μ 08, W μ 09, W μ 13, W μ 14, W μ 17, W μ 18, W μ 19, W μ 20, W μ 23, W μ 24	Tomasulo- Seccomandi <i>et al.</i> , 2003
		WS1, WS2, WS4, WS6	van den Bussche <i>et al.</i> , 1999
	Volavka červenavá (<i>Egretta rufescens</i>)	Er21, Er22, Er23, Er24, Er31, Er41, Er42, Er43, Er44, Er45, Er46, Er51	Hill <i>et al.</i> Green, 2011
	Volavka velká (<i>Ardea herodias</i>)	Ah205, Ah208, Ah209, Ah210, Ah211, Ah212, Ah217, Ah320, Ah341, Ah343, Ah414, Ah421, Ah517, Ah522, Ah526, Ah536, Ah630	McGuire <i>et al.</i> Noor, 2002
	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> , 2010

Tabulka č. 2 – pokračování.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitové lokusy	Literární zdroj
Potápky (Podicipediformes)	Potápka rudokrká (<i>Podiceps grisegena</i>)	PgAAT1, PgAAT3, PgAAT6, PgAAT8, PgAAT25, PgAAT34, PgAAT41	Sachs <i>et</i> Hughes, 1999
Potáplice (Gaviiformes)	Potáplice lední (<i>Gavia immer</i>)	GimA9, GimA12, GimC5, GimC11, GimD9, GimD12, GimE11	McMillan <i>et al.</i> , 2004
Dlouhokřídlí (Charadriiformes)	Alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	Apy06, Apy07	Dawson <i>et al.</i> , 2005
Vrubozobí (Anseriformes)	Kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APH07, APH08, APH09, APH12, APH13, APH16	Maak <i>et al.</i> , 2000
	Kachna pižmová (<i>Cairina moschata</i>)	CmAAT16, CmAAT35, CmAAT38	Stai <i>et</i> Hughes, 2003
	Kachnice laločnatá (<i>Biziura lobata</i>)	Blm1, Blm10, Blm12	Guay <i>et</i> Mulder, 2005
	Kajka mořská (<i>Somateria mollissima</i>)	Smo10	Paulus <i>et</i> Tiedemann, 2003
Tučňáci (Sphenisciformes)	Tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	AM13	Roeder <i>et al.</i> , 2001

4.4 Zpracování PCR produktů

Tento postup je optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biomera s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

- 1) Velké sklo bylo vydrhnuto kartáčkem, omyto deionizovanou vodou a osušeno. Plocha, která se měla dotýkat gelu, byla dvakrát omyta 96% ethanolem a osušena. Poté byl na tuto plochu nanesen přípravek pro odpuzování vody ze skel automobilů a nechal se 5 minut zaschnout. Poté byla plocha opláchnuta deionizovanou vodou a osušena papírových ručníkem.
- 2) Malé sklo bylo omyto vodou se saponátem a důkladně vydrhnuto kartáčkem. Po osušení byl na plochu, která se měla dotýkat gelu, dvakrát nanesen 96% ethanol. Poté bylo nanесeno molekulární lepidlo, které se nechalo 5 minut zaschnout. Sklo bylo potom čtyřikrát omyto 96% ethanolem a pokaždé dobře osušeno.
- 3) Velké sklo bylo položeno na polystyrenovou podložku ošetřenou plochou nahoru. Na dlouhé strany velkého skla byly položeny 0,4 mm silné spacery. Na ně bylo položeno malé sklo, ošetřenou stranou dolů. V místě spacerů byla skla sepnuta pomocí klipsů.
- 4) Gel byl připraven v kádince smísením 60 ml 6% roztoku akrylamid:N,N'-methalenbisakrylamid 19:1, 400 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného a 40 μ l N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu. Po důkladném promíchání byl gel naléván do prostoru mezi skly.
- 5) Jakmile byl celý prostor mezi skly vyplněn gelem, byl mezi skla, do hloubky 0,7 až 1 cm, vsunut rovnou stranou hřebínek. Skla v místě hřebínku byla sepnuta klipsy. Gel se nechal asi hodinu polymerizovat.
- 6) Po utužení gelu byly odstraněny klipsy a sklo bylo důkladně omyto od zbytků polyakrylamidu. Zvláštní důraz byl na čištění v okolí hřebínku. Poté bylo sklo osušeno a umístěno do elektroforetické komůrky hřebínkem nahoru.
- 7) Katodový i anodový prostor byl zalit 0,5 x TBE puřrem. Hřebínek byl opatřně vytažen a mezera mezi skly byla pečlivě vyčiřtřena proudem puřru z injekční střikačky. Po uzavřění katodového a anodového prostoru byly nasazeny elektrody a na zdroji stejnosměřného elektrického proudu byla nastavena hodnota výkonu 90 W (hodnoty elektrického napětí a proudu byly

3000 V a 150 mA). Gel byl poté nahříván asi 30 minut na teplotu 48–50 °C. Teplota byla kontrolována na teploměru umístěném na velkém skle.

- 8) Chvilí před dokončením nahřívání se smísilo 10 µl PCR produktu a 5 µl nanášecího pufru. Toto bylo vloženo na 3 minuty do termocykléru, aby došlo k denaturaci. Po vytažení z termocykléru byly vzorky okamžitě umístěny do ledové tříště, aby nedošlo k renaturaci.
- 9) Během denaturace byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu. Po otevření katodového prostoru byla znovu vyčištěna mezera pro hřebínek. Do mezery byl hřebínek vsunut zoubky přibližně 1 mm hluboko do gelu.
- 10) Do prostoru mezi zoubky hřebínku bylo pomocí osmikanálové pipety nanášeno po 2 µl denaturovaných vzorků. Po napipetování všech vzorků byl katodový prostor uzavřen, nasazena elektroda a na zdroji elektrického proudu byl nastaven výkon 70 W. Čas separace byl nejdříve 1,5 hod. U některých polymorfních vzorků byl čas separace zvýšen.
- 11) Během elektroforetické separace byl připraven fix/stop roztok, roztok 1% kyseliny dusičné HNO_3 a vývojka, která byla dána do ledničky.
- 12) Po uplynutí času elektroforetické separace, byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojeny elektrody a otevřen kanálek pro odtečení pufru z katodové oblasti. Sklo bylo z komůrky vyjmuto, spacers byly odděleny a pomocí nože bylo malé sklo odlepeno od velkého.
- 13) Malé sklo s přilepeným gelem bylo umístěno na třepačku do fotomisky gelem nahoru a zalito fix/stop roztokem. Působení fix/stop roztoku bylo asi 20 minut.
- 14) Poté byl fix/stop slit do baňky a sklo bylo 3 krát po dobu 2 minut omýváno deionizovanou vodou. Gel byl následně promýván na třepačce 5 minut v roztoku HNO_3 a poté byl roztok vylit a gel byl 4 krát po 2 minutách omyt deionizovanou vodou.
- 15) Sklo s gelem bylo umístěno do 0,1% roztoku AgNO_3 , do kterého bylo těsně před použitím přidáno 1,2 ml formaldehydu. V tomto roztoku bylo sklo ponecháno 30 minut.
- 16) Po 30 minutách bylo sklo ponořeno na 5 sekund do misky s deionizovanou vodou a přemístěno na třepačku do misky, ve které bylo následně zalito vývojkou. Bylo sledováno vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů. Když byly proužky dostatečně zřetelné, bylo vyvíjení zastaveno přilítím fix/stop roztoku.

17) Sklo bylo poté ponořeno asi na 2 minuty do deionizované vody a přemístěno na nejméně 30 minut do sušárny při 60 °C. Po vysušení, bylo sklo vyhodnoceno na negatoskopu. Po vyhodnocení bylo sklo s gelem umístěno do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l, ve kterém se gel odlepil. Sklo bylo umyto a připraveno znovu k použití.

4.5 Použité chemikálie

Akrylamid (AppliChem)

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

Bromfenolová modř (Serva)

Deionizovaná voda

Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400 μl každého), U 1240 (Promega)

Dusičnan stříbrný (Lachema)

Ethanol – 96% roztok (Lihovar Vrbátky)

Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachema)

Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)

Fenol (Sigma)

Formaldehyd (Lachema)

Formamid (Lachema)

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 (AppliChem)

N,N,N',N'-tetramethylendiamin (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)

4.6 Použité roztoky

Zásobní roztok 6% akrylamidu:

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

Polyakrylamidový 6% gel:

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

Zásobní roztok 10x TBE pufru:

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

Fix/stop roztok:

88 ml ledové kyseliny octové
800 ml deionizované vody

Nanášecí pufr pro elektroforézu:

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

Roztok 1% kyseliny dusičné HNO₃:

12 ml 65% HNO₃
800 ml deionizované vody

Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného AgNO₃:

0,8 g AgNO₃
doplnit objem deionizovanou vodou na 800 ml
před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Vývojka:

24 g uhličitanu sodného Na₂CO₃
800 ml deionizované vody
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 Na₂S₂O₃

Roztok 10% peroxidisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈:

1 g peroxidisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈
rozpustit v 10 ml deionizované vody
uchovávat v chladničce

Roztok hydroxidu sodného NaOH 1 mol/l:

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

Molekulární lepidlo:

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

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 μ l zásobního roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
rozpustit v 900 ml deionizované vody
doplnit deionizovanou vodou na 1 l a zfiltrvat

4.7 Laboratorní přístroje

Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)

Elektroforetický zdroj EV 232 (Consort)

Chladnička kombinovaná (Whirlpool)

Laboratorní váhy MARK S 622 (BEL Engineering)

Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)

Mikropipety Finnipipette 0,5 μ l až 10 μ l (osmikanálová) (Labsystems)

Mikropipety Finnipipette 0,3 μ l až 1 ml (Labsystems)

Mikropipety Nichipipet EX 0,5 μ l až 1 ml (Nichiryo)

Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)

Negatoskop NEGA1 (Maneko)

Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)

Sušárna – sterilizátor CAT 8050 (Conthern)

Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)

Termocyklér GenePro (BIOER technology)

Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)

Termocyklér XP Thermal Cycller (BIOER technology)

Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)

Vortex MS2 (Ika)

Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)

Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5 Výsledky

6 Diskuze

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo nalézt, pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace, polymorfní mikrosatelitové lokusy u marabu afrického (*Leptoptilos crumeniferus*). DNA marabu afrického byla izolována z krve šesti nepříbuzných jedinců, jež byla získána ze ZOO Dvůr Králové. K *cross-species* PCR amplifikaci bylo použito celkem 187 párů primerů. Testovány byly všechny páry primerů, které pocházely od druhů z řádu brodiví (Ciconiiformes). Dále byly testovány všechny páry primerů navržené pro řád potápky (Podiipediformes) a potáplice (Gaviiformes), dva páry primerů navržené pro řád dlouhokřídlí (Charadriiformes), některé páry primerů navržené pro řád vrubozobí (Anseriformes) a jeden primerový pár navržený pro řád tučňáci (Sphenisciformes).

Testováním bylo nalezeno 29 polymorfních mikrosatelitových párů primerů. Tři z těchto primerů amplifikovaly dva mikrosatelitové lokusy a jeden amplifikoval dokonce tři mikrosatelitové lokusy. Celkem tedy bylo nalezeno 34 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Jedenáct polymorfních lokusů bylo amplifikováno páry primerů pocházející od nesyta lesního (*Mycteria americana*), šest od čápa bílého (*Ciconia ciconia*), pět od ibise japonského (*Nipponia nippon*), čtyři od čápa východního (*Ciconia boyciana*), tři od kolpíka malého (*Platalea minor*) a po jednom polymorfním lokusu od druhů ibis rudý (*Eudocimus ruber*), kvakoš noční (*Nycticorax nycticorax*), volavka červenavá (*Egretta rufescens*), volavka žlutozobá (*Egretta eulophotes*) a alkounek drobný (*Aethia pygmaea*). Nejúspěšnější čeledí z hlediska zisku polymorfních mikrosatelitových lokusů byla čeleď čápoovití (Ciconidae), ze které pocházelo celkem 21 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Důvodem toho je malá fylogenetická vzdálenost mezi marabu africkým a druhy, ze kterých byly izolovány páry primerů.

8 Seznam zkratek

A	adenin
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyseliny (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	dvouřetězcová DNA (<i>double-stranded DNA</i>)
dNTP	deoxynukleotid trifosfát (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
EPC	mimopárová kopulace (<i>extra-pair copulations</i>)
EPF	mimopárová fertilizace (<i>extra-pair fertilization</i>)
EPP	mimopárová paternita (<i>extra-pair paternity</i>)
G	guanin
kb	kilobáze
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné elementy (<i>long interspersed nuclear elements</i>)
Mb	megabáze
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
SINEs	krátké rozptýlené jaderné elementy (<i>short interspersed nuclear elements</i>)
SSRs	repetice jednoduchých sekvencí (<i>simple sequence repeats</i>)
STRs	krátké tandemové repetice (<i>short tandem repeats</i>)
T	thymin
T _a	teplota <i>annealingu</i>
VNTRs	variabilní počet tandemových repetice (<i>variable number of tandem repeats</i>)

9 Použitá literatura

- Anonymous (2012): Ciconiiform, navštíveno dne 15. 3. 2012 na: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/117649/ciconiiform> .
- 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, 138-148.
- Bennett P (2000): Demystified...Microsatellites. *Molecular Pathology* 53, 177-183.
- Benson G (1999): Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27, 573-580.
- Brown TA (2007): Klonování genů a analýza DNA. Úvod. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc. ISBN 9788024417196.
- Buschiazzi E, Gemmell NJ (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28, 1040-1050.
- Burnie D (2002): Zvíře. Obrazová encyklopedie živočichů všech kontinentů. Knižní klub, Praha. ISBN 8024208628.
- Burnie D (2008): Ptáci. Obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha. ISBN 9788024222356.
- Campbell NA, Reece JB (2006): Biologie. Computer Press, Brno. ISBN 8025111784.
- 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 shiskered 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.
- del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona. ISBN 8487334105.
- Ellegren H (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Genetics* 5, 435-445.

- Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M (2002): Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.
- Gaisler J, Zima J (2007): Zoologie obratlovců, 2. přepracované vydání. Academia, Praha. ISBN 9788020014849.
- Galbusera P, van Dongen S, Matthysen E (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1, 163-168.
- 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.
- Grady DL, Ratliff RL, Robinson DL, McCanlies EC, Meyne J, Moyzis RK (1992): Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 89, 1695-1699.
- Guay P-J, Mulder RA (2005): Isolation and characterization of microsatellite markers in musk duck (*Biziura lobata*: Aves) and their application to other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 5, 249-252.
- He L-P, Wan Q-H, Fang S-G, Xi Y-M (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics* 7, 157-160.
- Hill A, Green MC (2011): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* 3, 13-15.
- Huang X, Zhou X, Chen M, Fang W, Chen X (2010): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics* 11, 1211-1214.
- 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, 1537-1539.
- Chapuis M-P, Estoup A (2007): Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621-631.
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert AM (2006): Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1-29.

- Chybicki IJ, Burczyk J (2009): Simultaneous Estimation of Null Alleles and Inbreeding Coefficients. *Journal of Heredity* 100, 106-113.
- Ji Y-J, Liu YD, Ding Ch-Q, Zhang D-X (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4, 615-617.
- Jones AG, Ardren WR (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12, 2511-2523
- Maak S, Neumann K, von Lengerken G, Gattermann R (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics* 31, 233.
- McGuire HL, Noor MAF (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes* 2, 170-172.
- 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.
- Muckley A (2001): *Leptoptilos crumeniferus*, navštíveno dne 15. 3. 2012 na http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Leptoptilos_crumeniferus.html .
- Oliveira E, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294-307.
- Paulus KB, Tiedemann R (2003): Ten polymorphic autosomal microsatellite loci for the Eider duck *Somateria mollissima* and their cross-species applicability among waterfowl species (Anatidae). *Molecular Ecology Notes* 3, 250-252.
- Petrie M, Kempnaers B (1998): Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. *Trends in Ecology & Evolution* 13, 52-58.
- 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.
- Ramel C (1997): Mini- and Microsatellites. *Environmental Health Perspectives* 105, 781-789.

- Ramel G (1999): The Ciconiiformes, navštíveno dne 16. 3. 2012 na <http://www.earthlife.net/birds/ciconiiformes.html> .
- 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.
- Sachs JL, Hughes CR (1999): Characterization of microsatellite loci for red-necked grebes *Podiceps grisegena*. *Molecular Ecology* 8, 685-702.
- Santos MS, Gonçalves EC, Barbosa MSR, Silva A, Schneider MPC (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes* 6, 307-309.
- Sawyer GM, Benjamin RC (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes* 6, 677-679.
- Shephard 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.
- Snustad PD, Simmons MJ (2009): Genetika. Masarykova Univerzita, Brno. ISBN 9788021048522.
- Stai SM, Hughes CR (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics* 34, 387-389.
- Šeda O, Liška F, Šedová L (2005): Aktuální genetika, navštíveno dne 1. 3. 2012 na <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/> .
- Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J (2005): Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 8021038411.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros, Praha. ISBN 8000005794.
- Tautz D (1993): Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences, 21-28. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ (Eds.) *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Birkhäuser Verlag, Basilej, Švýcarsko. ISBN 0817627812.

- Tomasulo-Seccomandi AM, Schable NA, Bryan AL Jr., Brisbin IL Jr., del Lama SN, Glenn TC (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3, 563-566.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- van den Bussche RA, Harmon SA, Baker RJ, Bryan AL Jr., Rodgers JA Jr., Harris MJ, Brisbin IL, Jr (1999): Low levels of genetic variability in north american populations of the wood stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 116, 1083-1092.
- Vergnaud G, Deneud F (2000): Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Research* 10, 899-907.
- Veselovský Z (2001): Obecná ornitologie. Academia, Praha. ISBN 80-200-0857-8.
- Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* 14, 2807-2812.
- Wang H, Lou X, Zhu Q, Huang Y, Zhou L, Zhang B (2011): Isolation and Characterization of Microsatellite DNA Markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science* 28, 606-608.
- Wink M, Dyrce A (1999): Mating systems in birds: a review of molecular studies. *Acta Ornitologica* 34, 91-109.
- Yeung CKL, Hsu Y-Ch, Yao Ch-T, Li S-H (2009): 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, Patarnello 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. ISBN 8024607956.