

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Martina Janyšková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu
veslonozí a plameňáci u nesyta afrického
(*Mycteria ibis*)**

Bakalářská práce

Martina Janyšková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

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 cenné rady, odborný dohled, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Také bych chtěla poděkovat svým kolegyním v laboratoři za příjemnou atmosféru při práci a vzájemnou pomoc.

Souhrn

Vypracovala jsem bakalářskou práci na téma *cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu veslonozí a plameňáci u nesyta afrického (*Mycteria ibis*), ve které jsem se snažila o nalezení polymorfních mikrosatelitových markerů.

V teoretické části své bakalářské práce jsem se zabývala popisem řádu brodiví a jeho 5 čeledí. Podrobněji jsem se věnovala čeledi čápovití (Ciconiidae), kam patří i nesyt africký. Zpracovala jsem informace o životě a chování tohoto druhu. Dále jsem se zabývala repetitivními sekvencemi, jejich strukturou, vlastnostmi a možnostmi využití pro populační studie. V posledním oddíle teoretické části jsem popsala navrhování mikrosatelitů *de novo* a metodou *cross-species* PCR amplifikace, také jsem shromáždila informace o mikrosatelitových lokusech navržených pro plameňáky (Phoenicopteriformes) a veslonohé (Pelecaniformes).

Praktickou část bakalářské práce jsem věnovala hledání polymorfních lokusů u nesyta afrického metodou *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových primerů. Otestovala jsem všechny páry primerů odvozené od druhů z řádu plameňáci a veslonozí.

Z celkového počtu 207 párů primerů jsem našla 37 polymorfních u nesyta afrického. 8 párů primerů pocházelo od 2 druhů plameňáků a 29 párů primerů od druhů z řádu veslonozí. Celkem jsem našla 38 polymorfních lokusů, protože 1 pár primerů odvozený od kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*) amplifikoval 2 polymorfní lokusy. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 7.

Summary

I worked out a bachelor thesis on the topic Cross-species amplification of microsatellites from Pelecaniformes and Phoenicopteriformes in yellow-billed stork (*Mycteria ibis*). I tried to find out polymorphic microsatellite markers.

In the theoretical part of my bachelor thesis I dealt with description of the order Ciconiiformes and its 5 families. In great details I dealt with family Ciconiidae where yellow-billed stork belong. I compiled informations about life and behavior of this species. Further I dealt with repeat sequences its structure, properties and utilization in population studies. In a last chapter of theoretical part I described a design of primers *de novo* and cross-species PCR amplification I also compiled informations about Phoenicopteriformes and Pelecaniformes 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 Phoenicopteriformes and Pelecaniformes.

I found 37 polymorphic microsatellite primer pairs of the total 207 tested. 8 primer pairs derived from 2 species of the order Phoenicopteriformes and 29 primer pairs derived from Pelecaniformes. I found 38 polymorphic loci, because one primer pair derived from flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*) amplified 2 polymorphic loci. Number of alleles per locus ranged from 2 to 7.

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíle práce	8
3 Literární přehled	9
3.1 Řád brodiví	9
3.1.1 Čeleď volavkovití	10
3.1.2 Čeleď kladivoušovití	11
3.1.3 Čeleď člunozobcovití	11
3.1.4 Čeleď ibisovití	11
3.1.5 Čeleď čápkovití	12
3.2 Repetitivní sekvence DNA	15
3.2.1 Rozptýlená repetitivní DNA	15
3.2.2 Tandemově repetitivní DNA	15
3.3 Hledání mikrosatelitových lokusů	19
3.4 Mikrosatelitové lokusy navržené pro druhy z řádu plameňáci	20
3.5 Mikrosatelitové lokusy navržené pro druhy z řádu veslonozí	20
4 Materiál a metody	26
4.1 Biologický materiál	26
4.2 Izolace genomické DNA z ptačí krve	26
4.3 PCR amplifikace	27
4.4 Zpracování PCR produktů	31
4.5 Použité chemikálie	33
4.6 Použité roztoky	35
4.7 Laboratorní přístroje	37
5 Výsledky	39
6 Diskuze	50
7 Závěr	58
8 Seznam zkratk	59
9 Použitá literatura	60

1 Úvod

Nesyt africký (*Mycteria ibis*) je brodivý pták z čeledi čápovitých (Ciconiidae). Je to středně velký pták s mírně zahnutým zobákem. Peří je převážně bílé s růžovým nádechem, zobák je žlutý a neopeřená hlava červená. Nesyt africký je společenský druh a ve volné přírodě se pohybuje v menších skupinách. K životu preferuje mokřady a mělké vodní plochy, kde loví potravu. Tento druh obývá rozsáhlá území subsaharské Afriky, Madagaskar a může se objevit i v Maroku, Tunisku či Egyptě.

K ochraně a studiu struktury populace tohoto druhu by mohly posloužit polymorfní mikrosatelitové markery. Dosud pro tento druh nebyly žádné nalezeny. V této práci se budu zabývat hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů u nesyta afrického pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace. K tomuto účelu použiji 47 párů primerů navržených původně pro 2 druhy plameňáků (Phoenicopteriformes) a 160 párů primerů původně navržených pro 12 druhů veslonohých (Pelecaniformes).

2 Cíle práce

1. Shromáždit literární zdroje obsahující řešenou problematiku.
2. Sepsat literární rešerši na zadané téma bakalářské práce.
3. Metodou *cross-species* PCR amplifikace otestovat všechny dosud publikované mikrosatelity z řádu veslonozí (Pecelaniiformes) a z řádu plameňáci (Phoenicopteriformes) na genomické DNA nesyta afrického (*Mycteria ibis*).
4. U polymorfních mikrosatelitů optimalizovat teplotu *annealingu* a určit počet alel.

3 Literární přehled

3.1 Řád brodiví

Řád brodiví (Ciconiiformes) je tvořen 5 čeleděmi, které čítají 115 druhů ptáků (Šťastný *et al.*, 1998). Často se objevují názory, že se nejedná o monofyletický taxon. Molekulární studie ukázaly příbuznost brodivých s kondory, kteří jsou řazeni do řádu dravců (Falconiformes) (Burnie, 2008). Podle aktuálních informací lze v naší volné přírodě spatřit devět druhů brodivých ptáků: čápa bílého (*Ciconia ciconia*), čápa černého (*Ciconia nigra*), volavku bílou (*Ardea alba*), volavku červenavou (*Egretta rufescens*), volavku stříbřitou (*Egretta garzetta*), bukače velkého (*Botaurus stellaris*), bukáčka malého (*Ixobrychus minutus*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a kolpíka bílého (*Platalea leucorodia*).

Radíme zde středně velké až velké ptáky s dlouhýma nohama, krkem a zobákem. Jejich tělo je anatomicky přizpůsobeno k chůzi v mělké vodě např. v bažinatých biotopech, kde získávají potravu (Gaisler *et Zima*, 2007). Velikost těla se pohybuje od 30 do 150 cm a hmotnost od 100 g do 9 kg (Bohuš *et Matis*, 2009). Všichni brodiví jsou výbornými letci. Nad pevninou využívají termické vzdušné proudy k plachtění (Šťastný *et al.*, 1998). Tito ptáci obývají všechny kontinenty kromě Antarktidy (Bohuš *et Matis*, 2009).

Společným znakem brodivých je tvar zobáku, který je většinou dlouhý a špičatý (Hanzák *et Hudec*, 1963). Takovýto zobák mají především druhy, které se živí rybami. Druhy, které se živí korýši nebo červy, mají zobák zahnutý nebo lžicovitě rozšířený, uzpůsobený ke hmatání (Hanzák, 1974). Brodiví se živí hlavně živočišnou potravou. Loví malé i velké obratlovce například ryby, obojživelníky, plazy, ale i malé savce (Bohuš *et Matis*, 2009). Mezi brodivými se nacházejí i mrchožraví ptáci, kteří mají lysý krk a hlavu. Krk je dlouhý a tenký, tvoří ho 16-20 krčních obratlů, takže je velmi ohebný (Hanzák, 1974). Volavky mají typický esovitě stočený krk (Hanzák *et Hudec*, 1963). Žaludek je třídílný a vole obvykle chybí.

Nohy brodivých jsou dlouhé, kráčivé či brodivé. Palec je dobře vytvořený a nízko nasazený (Gaisler *et Zima*, 2007). Aby se ptáci mohli v bahně pohybovat jistě, mají některé druhy mezi prsty plovací blány, které jim pomohou rozložit hmotnost na větší plochu (Burnie, 2008). Druhy, které mají kratší nohy, se nebrodí vodou, ale číhají na potravu v bezprostřední

blízkosti vodní hladiny. Na těle se mohou vyskytovat místo peří kožovitá holá místa. Častá jsou i ozdobná pera v týlu. Celkové opeření je poměrně řídké. Zbarvení obou pohlaví je většinou stejné, samice bývají méně nápadné. Mladí ptáci mohou vypadat odlišně (Šťastný *et al.*, 1998).

Většina brodivých hnízdí v koloniích, které mohou čítat až tisíce párů (Šťastný *et al.*, 1998). Koloniální druhy hnízdí na stromech nebo v mangrovových porostech (Burnie, 2008). Hnízda jsou umístěna zpravidla na ostrovech uprostřed vodních ploch, nebo nedaleko nich, nejčastěji na stromech, keřích, v porostech bažinatých rostlin (Šťastný *et al.*, 1998). Bukači hnízdí v rákosinách a jejich hnízda jsou perfektně maskovaná (Burnie, 2008). Brodiví mívají 2-10 vajec, jejich vysezování trvá 16-38 dní. Mláďata jsou krmivá a potravu jim přinášejí oba rodiče (Šťastný *et al.*, 1998). Volavky vkládají potravu mláďatům přímo do zobáku, čápi ji vyvrhují do hnízda (Bohuš *et Matis*, 2009). Mláďata zůstávají v hnízdě několik týdnů (Burnie, 2008). Pohlavní dospělosti dosahují mezi 1. až 5. rokem (Šťastný *et al.*, 1998). Když hnízdí sezóna skončí, mnohé druhy táhnou zimovat do teplejších oblastí (Burnie, 2008).

Některé druhy tohoto řádu se ocitly na seznamu ohrožených druhů (Burnie, 2008). Některé jsou až kriticky ohrožené a existují jen v malém počtu (Šťastný *et al.*, 1998). Někteří se však přizpůsobili zásahům do přírody a například volavka rusohlavá (*Bubulcus ibis*) našla na rozšířených rýžových polích nové loviště (Burnie, 2008).

3.1.1 Čeled' volavkovití

Čeled' volavkovití (Ardeidae) zahrnuje středně velké až velké ptáky s klínovitým zobákem. Jejich krk je i při letu esovitě prohnutý. Řadí se zde celkem 65 druhů (Gaisler *et Zima*, 2007). Volavky mají štíhlé tělo, nohy a zobák jsou dlouhé. Kvakoši mají nohy i krk kratší. U volavkovitých se nevyskytuje pohlavní dimorfismus. Samci i samice mají stejnou velikost těla (del Hoyo *et al.*, 1992). V období toku jsou kvakoši pestřeji zbarvení (Felix, 1976). Volavky dokážou nehnutě stát a trpělivě čekají na kořist (Hanzák, 1974). Svou kořist loví tzv. harpunováním. Jakmile je kořist v dostatečné blízkosti, vymrští se stočený krk a zobák kořist zasáhne. Volavkovití stavějí svá hnízda na stromech, v křovinách nebo v porostech vodního rostlinstva. Hnízdí v koloniích. Mívají 3-6 vajec, menší druhy 7-8 (Hanzák *et Hudec*, 1963).

3.1.2 Čeleď kladivoušovití

Čeleď kladivoušovití (Scopidae) zahrnuje jen jediný druh, tím je kladivouš africký (*Scopus umbretta*). Je to středně velký pták, který je celý hnědý. Jeho zobák je u kořene vysoký a ze stran zploštělý. Na hlavě má širokou dozadu směřující chocholku. Za letu má krk jen lehce ohnutý (Hanzák *et* Hudec, 1963). Kladivouši žijí v mokřadech, kde loví žáby, malé rybky, červy, hmyz i malé savce (del Hoyo *et al.*, 1992).

Kladivouši jsou zajímaví i proto, že si stavějí velmi svérázná a nápadná hnízda, které je kulatá o průměru 1,5 až 2 m a bývá umístěno v nízkých křovinách, nebo na stromech ve vidlici větví. Stavebním materiálem jsou kosti, hadry, kusy kůže, větve, rákos i drny. Kladivouši mívají 4 až 6 vajec (Hanzák *et* Hudec, 1963). Kladivouši se vyskytují na jih od Sahary, na Madagaskaru a v jihozápadní Arábii (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.3 Čeleď člunozobcovití

Jediným zástupcem čeledi člunozobcovití (Balaenicipitidae) je člunozobec velký (*Balaeniceps rex*). Tento pták je asi 115 cm vysoký a šedě zbarvený. Jeho hlava je vzhledem k tělu velká (Montgomery, 2013). Jeho zobák má zajímavý tvar, je na hřebeni lehce prohnut a vpředu vybíhá v silný hák. Zobák je dlouhý 19 cm (Šťastný *et al.*, 1998) a je uzpůsobený k lovu potravy, kterou jsou hlavně ryby, ale i žáby, želvy a malí krokodýli (Hanzák *et* Hudec, 1963). Hnízdo může být až metr vysoké a je vytvořené z větví a rákosu. Hnízdo si zakládají v bažinách (Montgomery, 2013). Snáší 2 zelenavá vejce. Jedinci se na hníždě zdraví klapáním zobáku, podobně jako čápi (Hanzák *et* Hudec, 1963).

3.1.4 Čeleď ibisovití

Do čeledi ibisovití (Threskiornithidae) jsou zařazeni středně velcí ptáci. Čeleď se dělí na dvě podčeledi ibisové a kolpíci. Ibisové mají zobák dlouhý a srpovitě zahnutý. Kolpíci mají zobák rovný, nízký a vpředu zploštělý a rozšířený.

Ibisové mají dlouhé nohy se čtyřmi prsty. Tři přední prsty jsou u kořene spojeny blankou (Hanzák *et* Hudec, 1963). Někteří mají na hlavě nebo na krku lysá místa nebo kožovité záhyby. Obě pohlaví jsou stejně zbarvená, samci bývají větší než samice. Mladí jedinci mají matné peří (Šťastný *et al.*, 1998). Potravu ve vodě zobákem sbírají (Hanzák *et* Hudec, 1963). Živí se především korýši, měkkýši, vodním hmyzem, rybkami či žábami (Šťastný *et al.*, 1998). Jsou to ptáci bažin a močálů (Hanzák *et* Hudec, 1963).

Kolpíci jsou větší ptáci podobní čápům. Potravu získávají tak, že svým lžícovitým zobákem pohybují ve vodě ze strany na stranu. Potravou jsou jim drobní vodní živočichové (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.5 Čeled' čápoovití

Do čeledi čápoovití (Ciconiidae) řadíme 19 druhů ptáků, které dělíme do 3 tribů. Trib Mycteriini zahrnuje dva rody nesyť (*Mycteria*) a zejzob (*Anastomus*). Ptáci zařazení do tohoto tribu jsou menší a žijí v koloniích. Trib Ciconiini zahrnuje jeden rod čáp (*Ciconia*). Většina druhů rodu čáp jsou středně velcí ptáci, kteří mají zobák univerzálně stavěný a živí se tak různými druhy potravy. Trib Leptoptilini zahrnuje tři rody. Rod čáp (*Ephippiorhynchus*), jabiru (*Jabiru*) a marabu (*Leptoptilos*). Do tohoto tribu jsou řazeni velcí čápi s masivními zobáky.

Čápoovití jsou velcí ptáci, mohutnější stavby těla. Mají dlouhé zobáky, krk i nohy. Největší ptáci této čeledi se řadí k největším létavým ptákům na světě. Samci čápa marabu mohou dosáhnout výšky až jeden a půl metru a váhy téměř 9 kg. Obecně jsou samci o něco větší než samice, ale některé druhy se liší minimálně (del Hoyo *et al.*, 1992). Většina druhů je zbarvena černo-bíle, samci i samice jsou zbarveni stejně (Šťastný *et al.*, 1998). Velikost zobáku se u ptáků z čeledi čápoovitých příliš neliší, až na zobák čápa marabu. Tvar zobáku je proměnlivý a přizpůsobený potravě, kterou se ptáci živí (del Hoyo *et al.*, 1992). Potravu si ptáci sbírají při chůzi v mělké vodě nebo na suchu (Šťastný *et al.*, 1998).

Čápoovití mají dlouhá, široká křídla, která jsou přizpůsobená k plachtění. Při letu ve skupině nelétají ve formaci. Rozpětí křídel u rodu marabu dosahuje 320 cm. Při letu mají krk natažený dopředu a lze je tak snadno rozpoznat od volavek. Ocasní pera jsou krátká a nohy jsou při letu natažené. Čáp bílý (*Ciconia ciconia*) létá rychlostí až 45 km/h (Veselovský, 2001). Péči o peří stráví čápoovití hodně času.

Čápoovití jsou rozšířeni téměř po celém světě. Žijí blízko vodních ploch, dokáží žít i tam, kde je voda vzácná. Svá hnízda si stavějí na stromech, čápi bílí se dobře adaptovali na lidská obydlí a stavějí si hnízda třeba na střechách, nebo komínech. Ptáci tribu Mycteriini jsou společenšší a hnízdí v koloniích, ostatní čápoovití jsou spíše samotáři.

I když čápi nezpívají, nejsou úplně němí. Dospělí jedinci syčí, houkají, skřehotají nebo klapají zobáky. Klapání může být slyšitelné v širokém okolí. Čápi při něm zaklánějí hlavu na

záda, aby zvuk mohl rezonovat a nést se (del Hoyo *et al.*, 1992). Klapání zobáku je pozdravným signálem, vůči partnerovi nebo mladým, nebo varovným signálem vůči cizím čápům (Hanzák, 1974).

3.1.5.1 Rod nesyt

Zástupci rodu nesyt (*Mycteria*) patří do čeledi čápoovití. Řadí se zde středně velcí ptáci s neopeřenou hlavou, nebo její částí. Barva peří je bílá s červenými, růžovými a černými skvrnami. Charakteristický pro rod nesyt je vysoce specializovaný zobák. Na bázi je zobák zduřelý, ve střední části více kruhovitý než u ostatních čápů a na konci je mírně zahnutý dolů. Na zobáku se nacházejí senzitivní oblasti, které pomáhají rychlému sklapnutí zobáku při lovu v bahnitých vodách (Brown *et al.*, 1993).

Mezi zástupce rodu nesyt patří nesyt africký (*Mycteria ibis*), nesyt americký (*Mycteria americana*), nesyt bílý (*Mycteria cinerea*) a nesyt indický (*Mycteria leucocephala*).

Nesyt americký jako jediný z nesytů má neopeřený krk. Stejně jako nesyt bílý žije na pobřežních stanovištích. Obývá rozsáhlé území, které sahá od jihu Spojených států amerických, až po Argentinu (del Hoyo *et al.*, 1992).

Nesyt bílý žije v Kambodži, Malajzii a Indonézii (Kůs, 2000). V současné době je na seznamu ohrožených druhů, protože u něj došlo k rychlému úbytku populace v důsledku intenzivního odlovu a ztrát pobřežních stanovišť (Iqbal *et al.*, 2008).

Nesyt indický má dlouhý, žlutý zobák, hlava je zbarvena do oranžova a nohy jsou růžové. Výrazně růžové je i peří na ocasu (Anonymous, 2014). Tento druh obývá území Indie, Srí Lanky a Indočíny až po jižní Čínu (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.1.5.1.1 Nesyt africký

Nesyt africký (*Mycteria ibis*), viz obrázek č. 1, je zástupcem čeledi čápoovitých, tribu Mycteriini. Je 95-105 cm vysoký, rozpětí křídel je až 165 cm. Dominantní barvou je bílá, černá barva se objevuje na letkách a ocasu. Čelo a hlava jsou neopeřené a mají červenou barvu (Brown *et al.*, 1993). V období páření se červená barva na hlavě zjasňuje a bílé peří dostává růžový nádech (Burnie, 2008). Dlouhé nohy jsou červené. Zobák je dlouhý, zašpičatělý a mírně zahnutý směrem dolů. Má jasnou žlutou barvu (Brown *et al.*, 1993). Mladí ptáci jsou šedohnědí (Šťastný *et al.*, 1998).

Obrázek č.1: Nesyt africký, Foto Milan Kořínek.



Nesyt africký je společenský druh. Hnízdí v malých koloniích na skalách a stromech. Často ve společnosti volavek a kormoránů (Brown *et al.*, 1993). V západní Africe někdy hnízdí i ve městech. Hnízdo staví samec se samicí společně a každý rok jej opravují.

Přírodním prostředím nesytů jsou močály, břehy řek a jezer, písčiny, rýžová pole či mořské mělčiny (del Hoyo *et al.*, 1992). Potravou nesytů jsou malé rybky, žáby, korýši, červi a hmyz (Burnie, 2008). Většinu potravy si nesyt uloví ve vodě. Při lovu se prochází, jeho tělo je předkloněné a zobák, někdy i celá hlava jsou ponořené pod hladinou. Zobák je mírně pootevřený, když pták narazí na kořist, zobák okamžitě sklopne. Pomoci si může nesyt i nohou, kterou čeří bahno.

Hodně času stráví nesyti odpočinkem. Odpočívají v dřepu na běhácích. Jejich pohyby jsou pomalé a klidné (Brown *et al.*, 1993). Málókteří jedinci jsou stálí, většinou dochází k migračním pohybům (Šťastný *et al.*, 1998). Nesyt africký se vyskytuje v Africe na jih od Sahary, na Madagaskaru, rozptýleně taky v Maroku, Egyptě a v Tunisku (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.2 Repetitivní sekvence DNA

V eukaryotických genomech většina DNA nekóduje proteiny ani RNA. Mimo intronů, regulujících sekvencí aj. je nekódující DNA tvořena hlavně repetitivními sekvencemi. Repetitivní sekvence jsou takové, které se v genomu nacházejí v mnoha kopiích. Většinou se nenacházejí uvnitř sekvence genů (Campbell *et* Reece, 2006). Genomy mnohobuněčných eukaryot obsahují mnoho repetitivní DNA (15-80 %) a množství tohoto genetického materiálu je ve většině případů v přímém vztahu k velikosti genomu (Snustad *et* Simmons, 2009). Repetitivní sekvence mohou být rozděleny do dvou typů v závislosti na tom, zda jsou repetitivní jednotky v genomu uspořádány rozptýleně nebo tandemově (Bennett, 2000).

3.2.1 Rozptýlená repetitivní DNA

Opakované jednotky rozptýlené repetitivní DNA nejsou řazeny jedna za druhou, jsou roztroušeny po genomu. Jeden úsek je obvykle dlouhý sto až tisíc párů bází. Úseky jsou si podobné, ale většinou nejsou vzájemně identické (Campbell *et* Reece, 2006). Většina rozptýlených repetitivních sekvencí vzniká procesem transpozice nebo retrotranspozice (Šeda *et al.*, 2005). Sekvence DNA se mohou přemísťovat z jednoho místa chromozomu na jiné místo, nebo dokonce na jiný chromozom. Transponovatelné elementy sedělí na DNA transpozony a retrotranspozony.

Podle délky můžeme rozptýlené repetice dělit na dvě velké skupiny rozptýlených jaderných elementů – LINEs a SINEs (Bennett, 2000). LINEs (long interspersed nuclear elements) zahrnují transponovatelný element zvaný L1. Celý L1 element je dlouhý asi 6 kb. Lidský genom obsahuje 3000 až 5000 kompletních L1 elementů (Snustad *et* Simmons, 2009). SINEs (short interspersed nuclear elements) jsou typicky kratší než 500 párů bází a nemají žádný kódující potenciál (Šeda *et al.*, 2005). Hlavní rodinou SINEs jsou Alu elementy. Tyto elementy jsou dlouhé asi 300 nukleotidových párů (Campbell *et* Reece., 2006). Alu element je nejhojnější lidská sekvence (Bennett, 2000). Více než 1 milion Alu elementů tvoří 11 % lidského genomu.

3.2.2 Tandemově repetitivní DNA

Tandemové repetice jsou tvořeny za sebou jdoucími identickými nebo téměř identickými jednotkami (Šeda *et al.*, 2005). Nukleotidové složení je často dosti odlišné od zbytku buněčné DNA (Campbell *et* Reece., 2006). Sekvence s nejvyšším počtem kopií nekódují bílkoviny, ani nepodléhají transkripci. Sekvence s menším počtem kopií proteiny

kódují. Jedná se o proteiny, které musí být přítomny ve velkém množství, jako jsou například ribozomální proteiny nebo svalové proteiny. Centromerické a telomerické oblasti jsou tvořeny repetitivními sekvencemi (Snustad *et* Simmons, 2009).

Řada genetických poruch je způsobena abnormálně dlouhými úseky tandemově repetitivních nukleotidových tripletů, které se nacházejí uvnitř genu. Syndrom fragilního X je způsoben opakováním tripletu CGG. V normální alele je tento triplet opakován asi 30krát, v alele fragilního X je triplet opakován stokrát až tisíckrát a vytváří fragilní (křehké) místo. Huntingtonova choroba je také spojena s opakováním tripletů, a to CAG, které se prodlužují přes řadu generací. Všechny z dosud stanovených poruch spojených s tripletovým opakováním zasahují nervový systém (Campbell *et* Reece, 2006).

Podle velikosti opakující se jednotky a celkové délky repetice můžeme tandemové repetice rozdělit na satelity, minisatelity a mikrosatelity (Bennett, 2000).

3.2.2.1 Satelity

Název satelity je odvozen od latinského *satelles*, které znamená doprovodný. Svůj název satelity dostaly právě kvůli tomu, že při centrifugaci v hustotním gradientu chloridu cesného, vytvářejí jednu, nebo více menších frakcí vedle hlavní frakce DNA (Snustad *et* Simmons, 2009).

Základní jednotka satelitní DNA může být dlouhá od pěti párů bází až po několik stovek párů bází. Velikost celé repetice na jednom lokusu se může pohybovat od 100 kb až několika Mb.

3.2.2.2 Minisatelity

Minisatelitní DNA zahrnuje středně dlouhé repetice o celkové délce 100 párů bází až 20 kb (Bennett, 2000). Délka repetitivní jednotky se pohybuje od 10-60 párů bází, zpravidla 15-35 párů bází. Jednotky jsou tvořeny vlastním minisatelitem obklopeným lemujícími sekvencemi DNA. Sekvence minisatelitního jádra jsou velmi konzervativní a bohaté na guanin. Lemující sekvence se mezi jednotlivými lokusy liší (Zima *et al.*, 2004).

Minisatelitní DNA může být rozdělena do dvou typů – telomerická a hypervariabilní. Úseky telomerické DNA jsou dlouhé 10-15 kb, jsou tvořené jednotkami TTAGGG. Enzym telomeráza připojuje sekvence k telomerám všech chromozomů.

Hypervariabilní minisatelitní DNA má repetitivní jednotku o různé délce (Bennett, 2000). Repetice jsou obvykle vysoce polymorfní co do počtu opakování jednotky repetice (Šeda *et al.*, 2005). Proto se minisatelity někdy označují jako variabilní počet tandemových repetití neboli VNTRs (variable number of tandem repeats). Mutační rychlost je v těchto oblastech obrovská, takže v populaci se objevuje velmi velké množství alel (Zima *et al.*, 2004). Vysoká míra polymorfismu je předurčila k tomu, aby mohly sloužit jako genetické markery na poli DNA profilování známého pod pojmem DNA fingerprinting (Bennett, 2000).

3.2.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity se označují jako repetice jednoduchých sekvencí (SSRs) nebo krátké tandemové repetice (STRs) (Oliveira *et al.*, 2006). Jsou to tandemové repetice o délce jednotky 1-6 nukleotidů. Nacházejí se v genomu prokaryot i eukaryot (Buschiazzo *et al.*, 2006). Nacházejí se dokonce i v nejmenších bakteriálních genomech (Gur-Arie *et al.*, 2000). Celková délka sekvence mikrosatelitu se pohybuje od 20 až po několik stovek bází (Beckmann *et al.*, 1992). Mikrosatelity tvoří 3 % lidského genomu (Ellegren, 2004), kde se objevují s četností jeden mikrosatelit na 6 kb (Beckmann *et al.*, 1992).

Mikrosatelity se nacházejí jak v nekódujících, tak v kódujících oblastech genomu (Tóth *et al.*, 2000). Jejich přítomnost v kódujících oblastech je méně častá než v nekódujících oblastech. Je to nejspíš důsledek negativní selekce proti posunovým mutacím (Metzgar *et al.*, 2000).

Svou četností dominují dinukleotidové repetice následované mono- a tetranukleotidovými. Trinukleotidové repetice jsou nejméně časté. Nejčastěji se objevují CA repetice následované AT, GA a GC repeticemi (Ellegren, 2004). Mikrosatelity se dělí i podle typu opakující se sekvence a to na dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené. Dokonalé sekvence nejsou přerušované bázemi, které do motivu nepatří (např. TATATATATATATA). U nedokonalých sekvencí se uvnitř opakujícího motivu objeví báze, která do motivu nepatří (např. TATATATCTATATA). Přerušované mikrosatelity jsou přerušené krátkou sekvencí, která se neshoduje s opakujícím se motivem (např. TATATACGTGTTATATA). Složené mikrosatelity jsou tvořeny dvěma, k sobě přilehlými sekvencemi (např. TATATATAGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

3.2.2.4 Mutace mikrosatelitů

Mnoho mikrosatelitů je nestabilních, zejména CA dinukleotidy a na CG bohaté trinukleotidy, jsou variabilnější, než jiné repetice (Ramel, 1997). Vznik a evoluci mikrosatelitů mohou vysvětlit dva modely – sklouznutí nukleotidového řetězce a nerovnoměrný crossing-over (Chistiakov *et al.*, 2006).

Při procesu vzniku mikrosatelitu dojde ke sklouznutí nukleotidového řetězce. Nejprve dojde k lokální krátkodobé denaturaci dvouřetězcové molekuly DNA a následné renaturaci úseku s jinou přilehlou oblastí obsahující komplementární báze. Může docházet ke zmnožení i delecí určitého úseku. Ke sklouznutí může docházet i v průběhu samotné replikace.

Nerovnoměrný crossing-over nastává tehdy, když dojde k párování dvou komplementárních, ale přitom nehomologických úseků DNA a následnému crossing-overu mezi nimi (Flegr, 2009). Většina takových mutací je opravena reparačními mechanismy.

Mutační rychlost je odhadována na 10^{-2} - 10^{-6} na lokus a generaci (Ellegren, 2004). Analýza $(AC)_n$ mikrosatelitů u savců, ptáků, plazů, obojživelníků a ryb ukázala, že délka sekvence je hlavní faktor ovlivňující mutační rychlost (Neff *et Gross*, 2001).

3.2.2.5 Funkce a možnosti využití mikrosatelitů

Mikrosatelity přispívají k tvorbě struktury DNA, organizaci chromatinu, regulaci DNA rekombinace, transkripci a translaci. Ovlivňují genovou expresi a dynamiku buněčného cyklu (Chistiakov *et al.*, 2006). Avšak velké zmnožení repetice v určitém úseku může vyvolat neurodegenerativní onemocnění. Onemocnění vyvolána tímto způsobem jsou považována za pozůstatky evolučních procesů, které formovaly moderního člověka (Moxon *et Wills*, 1999).

Mikrosatelity se ukázaly být ideálními genetickými markery a to díky vysokému polymorfismu, kodominanci, krátké délce a četnosti s jakou se objevují v genomu. Mikrosatelity lze jednoduše detekovat a to použitím specifických primerů, které mikrosatelity ohraničují (Powel *et al.*, 1996). Jelikož jsou mikrosatelity dostatečně malé úseky, lze s nimi provést PCR amplifikaci a následně je separovat pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. V gelu lze jednoznačně rozlišit alelový polymorfismus (Bennett, 2000). Prostřednictvím analýzy mikrosatelitů lze určovat paternitu i vnitřní strukturu populací (Flegr, 2009).

Mikrosatelity mohou být využity v medicíně, kriminalistice, molekulární epidemiologii, parazitologii, populační genetice a při genetickém mapování (Chistiakov *et al.*, 2006).

3.3 Hledání mikrosatelitových lokusů

U druhů, kde jsou mikrosatelity zkoumány poprvé, musí být mikrosatelity izolovány *de novo*. To je způsobeno tím, že mikrosatelity se většinou nacházejí v nekódující DNA, kde jsou nukleotidové záměny častější než v kódující DNA. V důsledku toho nelze pro PCR amplifikaci použít univerzální primery. Na druhou stranu tzv. 'flanking' regiony, které obklopují mikrosatelity jsou u příbuzných druhů vysoce konzervativní. Izolace mikrosatelitů je náročná na čas i úsilí, které je potřeba pro jejich získání vynaložit.

Tradiční postup izolace začíná rozštěpáním kvalitní genomické DNA pomocí restričních endonukleáz, nebo pomocí ultrazvuku. Fragmenty DNA jsou poté rozděleny podle velikosti. Preferované jsou fragmenty, které mají délku 300-700 bází. Fragmenty jsou nalogovány do plazmidového vektoru a to přímo, nebo po přidání adaptorů. Proveďte se transformace bakterií a následně selekce klonů obsahujících repetitivní sekvence. Selekcce se provádí pomocí Southernova blottingu a následně hybridizace se sondou, která obsahuje repetitivní motiv. Sekvence obsahující repetitivní DNA se osekvenují a navrhnou se primery pro PCR amplifikaci těchto lokusů. Optimalizují se podmínky PCR reakce. Nezbytnou součástí je i statistické zhodnocení nalezených mikrosatelitových lokusů, které zahrnuje zkoušku polymorfismu, výpočet parametrů mikrosatelitového lokusu a jeho vypovídací hodnoty.

Tradiční postupy jsou úspěšné pouze u druhů s vysokou frekvencí mikrosatelitů. Pro druhy s nižší frekvencí mikrosatelitů, kam patří i ptáci, byly vytvořeny různé postupy, které zahrnují vytvoření genomické knihovny obohacené o repetitivní sekvence. Nové postupy izolace mikrosatelitových lokusů šetří čas a zvyšují efektivitu izolace (Zane *et al.*, 2002).

Skutečnost, že neexistují univerzální primery pro amplifikaci mikrosatelitů a že je potřeba nejdříve mikrosatelity izolovat *de novo*, může být překážkou pro jejich široké využití v laboratorní praxi. Řešením může být *cross-species* PCR amplifikace, která využívá primery již navržené pro jiný druh. Primmer *et al.* (1996) ve své studii provedli *cross-species* PCR amplifikaci s primery navrženými pro vlaštovku obecnou (*Hirundo rustica*) a lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*). *Cross-species* PCR amplifikace byla prováděna na devatenácti ptačích druzích nepatřících mezi pěvce a na dvaceti devíti druzích pěvců. Autoři zjistili, že úspěšnost amplifikace negativně koreluje se vzrůstající fylogenetickou vzdáleností druhů.

3.4 Mikrosatelitové lokusy navržené pro druhy z řádu plameňáci

Pro ptáky z řádu plameňáci (Phoenicopteriformes) byly dosud publikovány práce zabývající se izolací mikrosatelitů u dvou druhů plameňáků. Jedná se o mikrosatelity navržené pro plameňáka karibského a plameňáka růžového.

Kapil (2005) a Preston (2005) se ve svých dizertačních pracech zabývali mikrosatelitovými lokusy u plameňáka karibského (*Phoenicopus ruber*). Jejich výsledky jsou shrnuty v publikaci Kapil *et al.* (2010). Autoři izolovali a charakterizovali 9 polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka karibského. Na poloostrově Yucatán odebrali 60 vzorků krve, po izolaci DNA vytvořili genomickou knihovnu, kterou obohatili o repetitivní sekvence. Pozitivní klony byly osekvenovány a byly navrženy primery pro PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů. Hledání polymorfních lokusů probíhalo využitím PCR amplifikace 5-10 vzorků DNA, produkty reakce byly separovány v polyakrylamidovém gelu. Devět lokusů vykazovalo polymorfismus a byly dále charakterizovány. To zahrnovalo genotypizaci 60 jedinců divoké populace plameňáka karibského. Dále výpočet alelových frekvencí, stanovení Hardy-Weinbergovy rovnováhy a stanovení vazebné nerovnováhy. Počet alel na lokus se pohyboval od 3 do 14. Z 9 polymorfních mikrosatelitových lokusů 2 byly vytvářeny složenou repeticí a 7 repeticí dokonalou. Tyto lokusy byly doporučeny jako nástroj pro populační studie jak u řádu plameňáků tak u blízké příbuzných druhů.

Geraci *et al.* (2010) popsali 37 polymorfních mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového (*P. roseus*). DNA pro tvorbu genomické knihovny vyizolovali ze vzorků krve jedinců hnízdících ve Francii. 81 klonů obsahovalo mikrosatelity a primery byly navrženy pro 60 lokusů. Po PCR amplifikaci DNA 8 jedinců 37 párů primerů poskytovalo polymorfní produkt. Tyto páry primerů byly dále použity pro charakterizaci mikrosatelitových lokusů. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 33. Jeden lokus byl mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu, zbývajících 36 lokusů by mohlo sloužit jako účinný nástroj pro studium genetické diverzity a struktury populace.

3.5 Mikrosatelitové lokusy navržené pro druhy z řádu veslonoží

Pro ptáky z řádu veslonoží (Pelecaniformes) byly dosud publikovány práce zabývající se izolací mikrosatelitů u fregatkovitých (Fregatidae), pelikánovitých (Pelecanidae), terejovitých (Sulidae), kormoránovitých (Phalacrocoracidae) a featonovitých (Phaethontidae).

Mikrosatelitové lokusy navržené pro fregatkovité

Dosud byla publikována jedna práce zabývající se izolací mikrosatelitových lokusů u fregatkovitých, jedná se o mikrosatelitové lokusy fregatky obecné.

Dearborn *et al.* (2008) izolovali a charakterizovali 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů u fregatky obecné (*Fregata minor*). Vytvořili genomickou knihovnu s použitím DNA vyizolované z jednoho samce a jedné samice. Pomocí specifických primerů byla provedena PCR reakce a produkty byly separovány na agarozovém gelu. Produkty o velikosti 350-900 bází byly následně osekvenovány. Primery byly navrženy pro 28 lokusů. Z těchto 28 párů primerů jeden neamplifikoval DNA, další měl nespecifický produkt a osm párů primerů mělo monomorfní produkt. Zbývajících 18 párů primerů bylo testováno na 23 jedincích. Autoři našli od 2 do 12 alel na lokus. Testování ukázalo, že 3 lokusy mohou obsahovat nulové alely, jeden lokus vykazoval gametickou nerovnováhu a zbývajících 14 párů primerů by mohlo sloužit ke studiím zabývajícím se příbuzností mezi jedinci.

Mikrosatelitové lokusy navržené pro pelikánovité

Pro ptáky z čeledi pelikánovití byly publikovány práce zabývající se izolací a využitím mikrosatelitových lokusů u pelikána severoamerického a pelikána bílého.

Hickman *et al.* (2009) izolovali a charakterizovali devět mikrosatelitových lokusů pelikána severoamerického (*P. erythrorhynchos*). DNA pro vytvoření genomické knihovny byla vyizolována z krve tří jedinců. Bylo vybráno 25 párů primerů, které byly otestovány na vzorku 23 jedinců. Devět párů primerů amplifikovalo velmi kvalitní polymorfní PCR produkt. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 8. Tyto nové lokusy představují nástroj pro popis struktury populací a mohou být přínosem pro plánování jejich ochrany.

U pelikána bílého (*P. onocrotatus*) našli de Ponte Machado *et al.* (2009) 10 mikrosatelitových lokusů, za účelem určení stupně genového toku mezi populacemi. Z genomické knihovny vyizolovali 10 polymorfních lokusů, které otestovali na 46 jedincích pelikána bílého. Počet alel se pohyboval od 2 do 19. Primery navržené pro těchto 10 lokusů použili ke *cross-species* PCR amplifikaci tří dalších druhů pelikánů – pelikána afrického (*P. rufescens*), pelikána severoamerického (*P. erythrorhynchos*) a pelikána hnědého (*P. occidentalis*). Z deseti použitých párů primerů pouze osm amplifikovalo DNA. Z těchto osmi 4 páry primerů poskytovaly monomorfní produkt a 4 polymorfní produkt u každého z testovaných druhů.

Mikrosatelitové lokusy navržené pro terejovité

Dosud byly publikovány práce zabývající se návrhem mikrosatelitů *de novo* utereje modronohého, tereje guánového a tereje červenonohého.

Faircloth *et al.* (2009) izolovali a popsali první mikrosatelity pro rod terej (*Sula*). Izolovali 11 mikrosatelitových lokusů, které otestovali na 31 jedincích tereje modronohého (*S. neboxii*). Celkem otestovali 60 párů primerů, ze kterých pro genotypizaci vybrali 18 párů. 11 párů, po amplifikaci DNA 31 jedinců, vykazovalo polymorfní produkt. Počet alel na lokus se pohyboval od 3 do 22.

Izolací mikrosatelitů pro tereje modronohého a tereje guánového (*S. variegata*) se dále zabývali Taylor *et al.* (2010). Pro izolaci mikrosatelitových lokusů byla použita DNA od tří terejů modronohých a tří terejů guánových. Pro každý druh byla vytvořena genomická knihovna obohacená o repetitivní sekvence. 42 klonů vytvořených z DNA tereje modronohého obsahovalo mikrosatelity. Primery byly navrženy pro deset lokusů. 49 klonů vytvořených z DNA tereje guánového obsahovalo mikrosatelity a pro deset z nich byly navrženy primery. Všech 20 párů primerů bylo otestováno na 24 terejích modronohých a 27 terejích guánových. Všech 20 párů primerů bylo také otestováno na tereji žlutohém (*Sula leucogaster*) pro ověření úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace. Osm párů primerů poskytovalo polymorfní produkt u tereje modronohého a devět párů primerů poskytovalo polymorfní produkt u tereje guánového.

Morris-Pocock *et al.* (2010) izolovali a charakterizovali 15 nových mikrosatelitových lokusů u tereje červenonohého (*S. sula*). DNA pro vytvoření genomické knihovny získali z per 15 jedinců. 155 klonů obsahovalo mikrosatelity, primery byly navrženy pro 18 lokusů. Primery byly poté testovány ve třech fázích. V první fázi otestovali primery na vzorku 4 jedinců tereje červenonohého, kteří pocházeli z různých míst, kde se tento druh vyskytuje. Jeden pár primerů amplifikoval DNA pouze u jednoho jedince a byl proto vyřazen. Ve druhé fázi byla provedena genotypizace 14 jedinců se zbývajících 17 páry primerů. Dva páry primerů amplifikovaly u větší skupiny monomorfní produkt a byly také vyřazeny. Ve třetí fázi byla se zbývajících 15 páry primerů provedena genotypizace 30 jedinců. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 11.

Mikrosatelitové lokusy navržené pro kormoránovitě

Největší počet prací publikujících mikrosatelity, v rámci řádu veslonozí, se zabývá mikrosatelity u kormoránovitých. Byly publikovány práce zabývající se mikrosatelity u kormorána velkého, kormorána galapážského, kormorána ušatého, kormorána chocholatého a kormorána tasmánského.

Piertney *et al.* (1998) se zabývali izolací polymorfních lokusů u kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*) za účelem studia genového toku a struktury populace. DNA byla získána vysolovací metodou ze svalové tkáně a poté fragmentována pomocí restriční endonukleázy. Z jednotlivých fragmentů byla vytvořena genomová knihovna. Po vyselektování pozitivních klonů bylo 13 klonů osekvenováno a bylo navrženo 7 párů primerů. Pro další práci byla vyizolována DNA 100 nepříbuzných jedinců kormorána velkého. Po provedení PCR amplifikace byly produkty separovány v polyakrylamidovém gelu. Každý ze sedmi lokusů se ukázal být extrémně polymorfní. Počet alel na lokus se pohyboval od 9 do 49. Lokusy byly také testovány na kormoránu ušatém (*P. auritus*), kormoránu modronohém (*P. articeps*), kormoránu chocholatém (*P. aristotelis*) a na poddruhu kormorána velkého *P. c. novahollandiae*. U prvních tří jmenovaných 6 ze 7 navržených párů primerů amplifikovalo polymorfní produkt. U poddruhu kormorána velkého všechny navržené páry primerů amplifikovaly polymorfní produkt se 4 až 9 alelami na lokus.

Duffie *et al.* (2008) se zabývali popisem a izolací osmi mikrosatelitových lokusů kormorána galapážského (*P. harrisi*). Genomická knihovna byla vytvořena z DNA jedinců žijících v koloniích na ostrovech Isabela a Fernandina, ležících v Galapážském souostroví. Byly vyselektovány pozitivní klony a inzerty v plazmidech byly osekvenovány. Celkem bylo navrženo 24 párů primerů. Pro PCR reakci byla použita genomická DNA 4-8 jedinců z každé kolonie a podmínky PCR reakce byly optimalizovány. 8 párů primerů po PCR amplifikaci poskytovalo polymorfní produkt. Po provedení genotypizace byly vypočteny alelové četnosti a počet alel na lokus se pohyboval od 3 do 9.

Fike *et al.* (2009) se zabývali hledáním mikrosatelitových markerů pro kormorána ušatého (*P. auritus*). K vytvoření genomické knihovny sloužila DNA vyizolovaná ze svalové tkáně. Po osekvenování pozitivních klonů bylo navrženo 51 párů primerů pro PCR amplifikaci. 46 párů primerů amplifikovalo produkt o požadované velikosti a následně byly

tyto páry primerů použity pro testování polymorfismu jednotlivých lokusů. 24 lokusů bylo polymorfních a počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 13.

Dalších osm nových mikrosatelitů u kormorána ušatého popsali Mercer *et al.* (2010). Izolovali a charakterizovali osm variabilních dinukleotidových a tetranukleotidových mikrosatelitových markerů. Pro potřeby izolace byla vytvořena genomická knihovna obohacená o repetitivní sekvence. Vytvořili primery pro 40 mikrosatelitových lokusů. Primery byly testovány na 60 nepříbuzných jedincích. Osm párů primerů poskytovalo polymorfních produkt. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 17. Tyto primery použili i pro *cross-species* amplifikaci u dvou dalších druhů kormoránů a to u kormorána západního (*P. penicillatus*) a kormorána mořského (*P. pelagicus*). Všechny páry primerů poskytovaly u obou druhů polymorfní produkt.

Barlow *et al.* (2010) se věnovali izolaci mikrosatelitových lokusů u kormorána chocholátého (*P. aristotelis*). Vytvořili genomickou knihovnu obohacenou o repetitivní sekvence. Osekvenovali 48 klonů a navrhli primery pro 17 mikrosatelitů. Izolovali a charakterizovali pět dinukleotidových a pět tetranukleotidových mikrosatelitových lokusů. Genotypizace byla provedena na 20 jedincích z každé skotské a korsické populace. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 15.

Riordan *et al.* (2012) izolovali a charakterizovali mikrosatelity pro kormorána tasvánského (*P. fuscescens*). DNA, kterou vyizolovali z jaterní tkáň, byla osekvenována pomocí shot-gun sekvenování. Data byla analyzována a byly vyhledávány di, tri, tetra, penta a hexanukleotidové mikrosatelity. Všechny potenciální mikrosatelity byly analyzovány a byly vyloučeny ty, jejichž 'flanking' regiony byly podobné. Pro další práci bylo vybráno 31 lokusů. Tyto lokusy byly testovány na DNA 5 jedinců. Z 31 lokusů 16 bylo polymorfních, 13 monomorfních a 2 neamplifikovaly DNA spolehlivě. Sedm z 16 polymorfních lokusů bylo použito pro genotypizaci 42 nepříbuzných jedinců a byla vypočítána alelová četnost a provedeny další analýzy. Počet alel se pohyboval od 3 do 8.

Mikrosatelitové lokusy navržené pro faetonovité

V rámci čeledi faetonovití byla publikována práce zabývající se návrhem mikrosatelitů u faetona žlutozobého.

Humeau *et al.* (2011) vyizolovali a charakterizovali 11 mikrosatelitových markerů u faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*). DNA pro tvorbu genomické knihovny byla vyizolována z tkáně mrtvého jedince nalezeného na ostrově Réunion. 180 pozitivních klonů bylo osekvenováno a byly navrženy primery. 11 navržených párů primerů poskytovalo vyhovující produkt. Další testování primerů bylo provedeno na 55 jedincích. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 38.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Biologickým materiálem, ze kterého byla získána DNA, byla krev šesti jedinců nesyt afrického. Krev byla ptákům odebrána jejich ošetřovateli v ZOO Zlín-Lešná, kde je nesyt africký úspěšně chován. Odebraná krev byla odeslána do Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Krev byla uchovávána v lyzačním pufu v lednici při teplotě 4 °C.

4.2 Izolace genomické DNA z ptačí krve

Postup izolace genomické DNA z ptačí krve pro polymerázovou řetězovou reakci byl převzat podle Maniatis *et al.* (1982) a byl upraven pro technické a materiální podmínky Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Izolaci provedl vedoucí bakalářské práce.

1. Do mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml bylo napipetováno 400 µl roztoku krve v Queen's pufu.
2. K roztoku krve bylo připipetováno 100 µl roztoku proteinázy K (10 mg/ml) a překlápěním byla směs promíchána. Po promíchání bylo přidáno 100 µl 10% roztoku SDS.
3. Směs byla v termostatu překlápěna přes noc do druhého dne při 37 °C.
4. Druhý den bylo přidáno 350 µl fenolu a 350 µl chloroformu. Mikrozkuhavka byla následně zvortexována a zcentrifugována při 2000 g 5 minut. Po centrifugaci byla vrchní fáze odpipetována ustříženou špičkou do nové zkuhavky tak, aby nedošlo k nasátí vláken DNA se zbytky fenolu a chloroformu.
5. K odebranému roztoku bylo přidáno 700 µl chloroformu, mikrozkuhavka byla zvortexována a zcentrifugována při 2000 g 5 minut. Po centrifugaci byla vrchní fáze odebrána ustříženou špičkou do nové mikrozkuhavky, tak aby nedošlo k nasátí bílého zákalu proteinů z mezifáze. Krok 5 byl ještě jednou zopakován.
6. K odebranému roztoku bylo přidáno 180 µl vychlazeného octanu sodného o koncentraci 3 mol/l a objem byl doplněn vychlazeným 96% ethanolem. Zkuhavka byla promíchána překlápěním a uložena na 2 hodiny do -20 °C.

7. Mikrozkušavky byly centrifugovány při 13 000 g 30 minut.
8. Po centrifugaci byl ethanol opatrně slit tak, aby nedošlo k vylití sraženiny DNA. Ke sraženině byl napipetován 1 ml vychlazeného 70% ethanolu.
9. Mikrozkušavky byly centrifugovány při 13 000 g po dobu 10 minut.
10. Po centrifugaci byl ethanol opatrně slit tak, aby nedošlo k vylití sraženiny DNA a obsah zkumavky byl vysušen v termobloku.
11. K vysušené DNA bylo připipetováno 500 μ l TE pufru.
12. DNA byla přes noc překlápním v termostatu rozpouštěna při 40 °C.
13. Po stanovení koncentrace DNA na nanodropu byla část obsahu odebrána a zředěna na koncentraci 10-50 μ g/ml pro použití v PCR. Tato zředěná DNA byla uchovávána v lednici. Zbytek koncentrované DNA byl uchováván při -20 °C.

4.3 PCR amplifikace

Genomická DNA 6 jedinců nesyta afrického byla amplifikována páry primerů, které byly přidány do PCR mixu. Kompletní složení PCR mixuje uvedeno v tabulce č. 1. PCR mix byl připravován pro 6 vzorků.

Tabulka 1: Složení PCR mixu pro 6 vzorků.

Složky PCR mixu	Objem (μ l)
Deionizovaná voda	44,4
Reaction buffer 10x	6,7
MgCl ₂ (25 mmol/l)	4,0
dNTPs (20 μ mol/l)	0,7
Primer F (10 μ mol/l)	3,3
Primer R(10 μ mol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5U/ μ l)	1,0

Jednotlivé složky patřící do PCR mixu byly uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C. Před samotným pipetováním byly rozmrazeny při pokojové teplotě a poté zvortexovány a zcentrifugovány. PCR mix byl připravován do zkumavek o objemu 1,5 ml. Po přidání všech složek byl PCR mix zvortexován a zcentrifugován. Do všech šesti PCR mikrozkušavek o objemu 0,2 ml byl napipetován 1 μ l genomické DNA a 9 μ l PCR mixu. Takto připravené

mikrozkumavky byly umístěny do termocykléru. Časový a teplotní profil byl zvolen následovně:

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	

PCR amplifikace genomické DNA 6 jedinců nesyta afrického byla provedena se všemi dosud publikovanými páry primerů amplifikujícími mikrosatelity u plameňáků a veslonohých. Celkem bylo otestováno 207 párů primerů (viz tabulka 2). Bylo použito 47 párů primerů původně navržených pro plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*), kteří patří do řádu plameňáci (Phoenicopteriformes).

Zbývajících 160 párů primerů bylo původně navrženo pro druhy z řádu veslonozí (Pelecaniformes). Konkrétně byly použity primery navržené pro fregatku obecnou (*Fregata minor*), kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*), kormorána chocholatého (*P. aristotelis*), kormorána ušatého (*P. auritus*), kormorána tasmánského (*P. fuscescens*) kormorána velkého (*P. carbo*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pelikána severoamerického (*P. erythrorhynchos*), tereje guánového (*Sula variegata*), tereje modronohého (*S. nebouxii*), tereje červenonohého (*S. sula*) a faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*).

Tabulka 2: Přehled mikrosatelitových lokusů testovaných u nesyta afrického. Tabulka uvádí řád, zdrojový druh, název lokusu, autora a rok publikace.

Řád	Zdrojový druh	Testované lokusy	Autor publikace
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák karibský (<i>Phoenicopus ruber</i>)	Prμ 1, Prμ 2, Prμ 3, Prμ 4, Prμ 5, Prμ 6, Prμ 7, Prμ 8, Prμ 9	Kapil <i>et al.</i> , 2010
		Prμ 13	Preston, 2005
	Plameňák růžový (<i>Phoenicopus roseus</i>)	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139	Geraci <i>et al.</i> , 2010
Veslonozí (Pelecaniformes)	Fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18	Dearborn <i>et al.</i> , 2008
	Kormorán galapážský (<i>Phalacrocorax harri si</i>)	PhB2, PhB4, PhB11, PhC11, PhD11, PhF12, PhG8, PhG12	Duffie <i>et al.</i> , 2008
	Kormorán chocholatý (<i>Phalacrocorax aristotelis</i>)	Phaari01, Phaari02, Phaari03, Phaari05, Phaari06, Phaari08, Phaari11, Phaari12, Phaari14, Phaari16	Barlow <i>et al.</i> , 2010
Phaari04, Phaari07, Phaari09, Phaari10, Phaari13, Phaari15, Phaari17		podle Barlow <i>et al.</i> , 2010	

Tabulka 2: Pokračování 1.

Řád	Zdrojový druh	Testované lokusy	Autor publikace
Veslonoží (Pelecaniformes)	Kormorán tasmánský (<i>Phalacrocorax fuscescens</i>)	Pf7, Pf11, Pf13, Pf33, Pf35, Pf36, Pf39	Riordan <i>et al.</i> , 2012
	Kormorán ušatý (<i>Phalacrocorax auritus</i>)	Dcco-01, Dcco-02, Dcco-03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08	Mercer <i>et al.</i> , 2010
		COR 01, COR 03, COR 05, COR 06, COR 07, COR 12, COR 15, COR 17, COR 19, COR 20, COR 21, COR 22, COR 23, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 35, COR 38, COR 40, COR 41, COR 43, COR 45, COR 47	Fike <i>et al.</i> , 2009
	Kormorán velký (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	PcD2, PcD4, PcD5, PcD6, PcT1, PcT3, PcT4	Piertney <i>et al.</i> , 1998
	Pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265, PEL304	de Ponte Machado <i>et al.</i> , 2009
	Pelikán severoamerický (<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>)	PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 07, PeEr 08, PeEr 09	Hickman <i>et al.</i> , 2009
	Terej guánový (<i>Sula variegata</i>)	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-95, Sv2A-152, Sv2B-27, Sv2B-138	Taylor <i>et al.</i> , 2010
	Terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	Boob-RM2-F07, Boob-RM3-D07, Boob-RM3-F11, Boob-RM4-A08, Boob-RM4-B03, Boob-RM4-C03, Boob-RM4-D07, Boob-RM4-E03, Boob-RM4-E10, Boob-RM4-F11, Boob-RM4-G03	Faircloth <i>et al.</i> , 2009

Tabulka 2: Pokračování 2.

Řád	Zdrojový druh	Testované lokusy	Autor publikace
Veslonozi (Pelecaniformes)	Terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B-100	Taylor <i>et al.</i> , 2010
	Terej červenonohý (<i>Sula sula</i>)	Ss1b-16, Ss1b-51, Ss1b-57, Ss1b-98, Ss1b-106, Ss1b-142, Ss2b-2, Ss2b-35, Ss2b-48, Ss2b-71, Ss2b- 88, Ss2b-92, Ss2b-110, Ss2b-138, Ss2b-153	Morris- Pocock <i>et al.</i> , 2010
	Faeton žlutozobý (<i>Phaethon lepturus</i>)	P3A3, P3D7, P3C1, P4F2, P3F3, P3F5, P3A4, P3G12, P3F7, P4G1, P3H10	Humeau <i>et al.</i> , 2011

4.4 Zpracování PCR produktů

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

1. Nejdříve byla obě skla důkladně umyta kartáčkem a poté byla opláchnuta deionizovanou vodou. Následně byla skla osušena papírovým ubrouskem a dvakrát vyčištěna 96% ethanolem.
2. Očištěná plocha většího skla byla ošetřena přípravkem na odpuzování vody, který se používá na skla automobilů. Přípravek byl nanesen na tu plochu, která se dotýká gelu. Po zaschnutí přípravku (5 min) bylo sklo opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno papírovým ručníkem.
3. Menší sklo bylo ošetřeno molekulárním lepidlem. Lepidlo bylo nanesen na tu plochu, která se dotýká gelu. Lepidlo bylo rovnoměrně rozetřeno po celé ploše skla. Po řádném zaschnutí lepidla (5 min) bylo sklo čtyřikrát omyto 96% ethanolem a pokaždé dobře osušeno.
4. Větší sklo bylo položeno na polystyrenovou podložku ošetřenou plochou nahoru. Na delší okraje většího skla byly položeny 0,4 mm silné spacery. Na spacery bylo položeno menší sklo ošetřenou plochou směrem dolů. V místě spacerů byla skla zajištěna pomocí klipsů, na každé straně dvěma.

5. Polyakrylamidový 6% gel byl připraven v kádince. Po důkladném promíchání byl gel opatrně vlit mezi obě skla.
6. Jakmile byl celý prostor mezi skly vyplněn gelem, byl do gelu, do hloubky 1 cm, vložen hřebínek, a to rovnou stranou. Po vložení hřebínku byla skla ještě zajištěna čtyřmi klipsy. Gel se nechal minimálně 50 minut polymerizovat.
7. Po ztuhnutí gelu byly sundány klipsy a skla, s gelem mezi nimi, byla pomocí kartáčku omyta od zbytků zpolymerizovaného gelu. Důkladně bylo očištěno hlavně okolí hřebínku.
8. Takto připravená skla s gelem byla vložena do elektroforetické komůrky a to hřebínkem nahoru. Katodový i anodový prostor byl zalit 0,5 x TBE pufrem a hřebínek byl opatrně vyjmut z gelu. Prostor pro nanášení vzorů, který vznikl po vyjmutí hřebínku, byl vyčištěn proudem pufru z injekční stříkačky. Po vyčištění byl katodový i anodový prostor uzavřen a elektroforetická komůrka byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Na zdroji byl nastaven výkon 90 W (hodnota elektrického proudu 150 mA a hodnota napětí 3 000 V). Skla s gelem byla takto nahřívána po dobu 30 minut.
9. Během nahřívání skel s gelem, byly v digestoři připraveny vzorky a to přidáním 5 μ l nanášecího pufru k 10 μ l PCR produktu. Takto připravené vzorky byly těsně před koncem nahřívání skel s gelem vloženy do termocykléru, kde byly po dobu 3 minut denaturovány při 94 °C. Po denuraci byly vzorky okamžitě umístěny do ledové tříště, aby nedošlo k renaturaci.
10. Během denaturace vzorků byl vypnut zdroj stejnosměrného napětí. Znovu byla pečlivě vyčištěna mezera mezi skly. Po vyčištění byl do této mezery vložen hřebínek, ten byl orientován zoubky do gelu. Hloubka, kterou hřebínek zasahoval do gelu, byla asi 1 mm.
11. Pomocí osmikanálové pipety byly do prostoru mezi zoubky postupně naneseny všechny vzorky. Po nanesení vzorků byl katodový i anodový prostor znovu uzavřen a na zdroji byl nastaven výkon 70 W (elektrický proud 150 mA, napětí 3 000V). Čas separace byl určen na 1,5 hodiny. U některých polymorfních vzorků byl čas separace prodloužen.
12. Během elektroforetické separace byl připraven fix/stop roztok, roztok 1% kyseliny dusičné a vývojka, která byla uložena do ledničky.
13. Po uběhnutí doby elektroforetické separace, byl vypnut zdroj stejnosměrného napětí a odpojeny elektrody. Byl otevřen kanálek, aby mohl pufr z katodového

prostoru vytéct. Úchyty pro zajištění skel s gelem byly odšroubovány a skla, s gelem mezi nimi, byla vyjmuta z elektroforetické komůrky. Po vyjmutí byly odebrány spacery a skla byla od sebe oddělena pomocí nože. Gel zůstal přilepený na menším skle.

14. Malé sklo s gelem bylo umístěno do fotomisky na třepačku, gelem nahoru. Gel na skle byl zalit fix/stop roztokem. Působení fix/stop roztoku bylo 20 minut.
15. Po uběhnutí doby působení byl fix/stop roztok slit do baňky a uchován pro pozdější použití. Gel na skle byl třikrát po dvou minutách promyt deionizovanou vodou a umístěn na třepačku, kdy byl zalit roztokem kyseliny dusičné. Působení roztokem kyseliny dusičné bylo 4 minuty. Poté byl roztok kyseliny dusičné vylit a gel na skle byl čtyřikrát po dvou minutách promýván deionizovanou vodou.
16. Sklo s gelem bylo umístěno do fotomisky a zalito 0,1% roztokem dusičnanu stříbrného. Do roztoku dusičnanu stříbrného bylo těsně před použitím přidáno 1,2 ml formaldehydu. V tomto roztoku bylo sklo ponecháno 30 minut.
17. Po vyjmutí z roztoku dusičnanu stříbrného bylo sklo na 5 sekund ponořeno do misky s deionizovanou vodou. Po vyjmutí z vody bylo sklo s gelem umístěno do misky na třepačku, kde bylo zalito vývojkou. Vytvoření bylo sledováno a ve chvíli, kdy byly obarvené PCR produkty jasně zřetelné, bylo vytváření zastaveno přilítím fix/stop roztoku.
18. Po vytváření bylo sklo s gelem umístěno na 2 minuty do deionizované vody a poté asi na 30 minut do sušárny. Vysušený gel byl poté vyhodnocen na negatoskopu a naskenován pro pozdější kontrolu. Po vyhodnocení bylo sklo s gelem umístěno do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l, kde se gel odlepil od skla. Sklo bylo následně důkladně umyto a připraveno pro další použití.
19. U všech mikrosatelitových lokusů u všech 6 jedinců nesyta afrického byly z gelu vyčteny genotypy. Pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) byly mikrosatelitové lokusy charakterizovány a s použitím webové verze programu Genepop 4.2 (Rousset, 2008) byla ověřena vazba mezi lokusy.

4.5 Použité chemikálie

Akrylamid (Sigma)

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

Bromfenolová modř (Serva)

Deionizovaná voda

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

Dusičnan stříbrný (Lachema)

Ethanol-96% roztok (Lihovar Vrbátky)

Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachema)

Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)

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'-methylenbisakrylamid (AppliChem)

N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)

Octan sodný (Lachema)

Peroxodisíran amonný (Serva)

Proteináza K (Sigma)

Clear Vue, Rain Repellent (Turtle WAX)

Thiosíran sodný (Lachema)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)

Uhličitan sodný (Lachema)

Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.6 Použité roztoky

Zásobní roztok 6% akrylamidu:

420 g močoviny

484 ml deionizované vody

50 ml 10x TBE

150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid:N, N'-methylenbisakrylamid 19:1 po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné láhvi ve 4 °C

Polyakrylamidový 6% gel:

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈

40 µl N, N, N', N'-tetramethylethyldiaminu

Zásobní roztok 10x TBE pufru:

108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)

55 g kyseliny borité H₃BO₃

40 ml roztoku Na₂EDTA 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 na 800 ml deionizovanou vodou
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% peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈:

1 g peroxodisíranu 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 µl 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 µl 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 EV 232 (Consort)

Chladnička kombinovaná (Whirlpool)

Laboratorní váhy MARK S 622 (BEL Engeneering)

Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)

Mikropipety Finnpiette 0,5 µl až 10 µl (osmikanálová) (Labsystems)

Mikropipety Finnpiette 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)

Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)

Minicentrifuga CLE CSQSP (Cleaver Scientific)

Stolní centrifuga Prism Mini (Labnet International)

Negatoskop NEGA 1 (Maneko)

Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)

Sušárna-sterilizátor CAT 8050 (Contherm)

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

Termocyklér GenePro (BIOER Technology)

Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)

Termocyklér XP Thermal Cyclcr (BIOER Technology)

Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)

Vortex Mixer (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 metodou *cross-species* PCR amplifikace nalézt polymorfní mikrosatelitové lokusy u nesyta afrického. DNA 6 jedinců tohoto druhu byla amplifikována všemi existujícími páry primerů původně navrženými pro plameňáky a veslonohé. Celkem jsem otestovala 207 párů primerů. 47 párů primerů bylo navrženo pro plameňáky, zbývajících 160 pro veslonohé. Celkem jsem našla 37 párů primerů amplifikujících polymorfní produkt. 36 párů primerů amplifikovalo jeden polymorfní produkt a 1 pár primerů amplifikoval 2 polymorfní oblasti.

Otestováním párů primerů od plameňáků jsem našla 8, které amplifikovaly polymorfní produkt u nesyta afrického. 1 polymorfní lokus byl amplifikován párem primerů od plameňáka karibského a 7 polymorfních lokusů amplifikovaly primery od plameňáka růžového.

29 párů primerů navržených pro veslonohé u nesyta afrického amplifikovalo 30 polymorfních lokusů, protože jeden pár primerů amplifikoval produkt se 2 oblastmi polymorfismu. Polymorfní produkt amplifikovalo 5 párů primerů od fregatky obecné, 4 páry primerů od pelikána bílého, 3 páry primerů od kormorána ušatého, 3 páry primerů od kormorána velkého, 3 páry primerů od tereje modronohého, 2 páry primerů od kormorána galapážského, 2 páry primerů od kormorána chocholatého, 2 páry primerů od tereje guánového, 2 páry primerů od faetona žlutozobého a 1 pár primerů od pelikána severoamerického.

Nejvíce polymorfních lokusů u nesyta afrického jsem našla použitím párů primerů navržených pro plameňáka růžového. O něco úspěšnější *cross-species* PCR amplifikace proběhla s použitím párů primerů od veslonohých, kdy 29 párů primerů amplifikovalo polymorfní produkt, tj. 17,9 %. Otestováním párů primerů od plameňáků jsem našla 8 polymorfních lokusů, tj. 17 %.

Celkem u osmi lokusů jsem objevila možnou vazbu na pohlaví. U 7 lokusů by se mohlo jednat o vazbu na pohlavní chromozom Z, zbývajícím lokus Sn2A-36 se chová jako pohlavní marker. Aby mohlo být s určitostí řečeno, že se opravdu jedná o vazbu na pohlaví, bylo by potřeba otestovat větší počet samců a samic.

8 Seznam zkratek

A	adenin
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
F	<i>forward</i> primer
G	guanin
kb	kilobáze
L	<i>lower</i> primer
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné elementy (<i>long interspersed nuclear elements</i>)
Mb	megabáze
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
R	<i>reverse</i> primer
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</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	tymin
T _a	teplota <i>annealingu</i>
U	<i>upper</i> primer
VNTRs	variabilní počet tandemových repetic (<i>variable number of tandem repeats</i>)

9 Použitá literatura

Anonymous (2014): Painted stork (*Mycteria leucocephala*), navštíveno dne 8. 7. 2014na: <http://www.arkive.org/painted-stork/mycteria-leucocephala/>.

Barlow EJ, Telford A, Cavers S (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*, preprint.

Bartoňková I (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oboru PŘF UP v Olomouci).

Beckmann JS, Weber JL (1992): Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12: 627–631.

Bennett P (2000): Demystified...Microsatellites. *Molecular Pathology* 53: 177-183.

Bohuš M, Matis D (2009): Velká kniha živočichů: hmyz, ryby, obojživelníci, plazi, ptáci, savci: 1582 barevných ilustrací. Příroda, Bratislava.

Brown LH, Urban EK, Newman K (1993): The birds of Africa. Vol. 1, Academic Press, London.

Burianová E (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oboru PŘF UP v Olomouci).

Burnie D (2008): Ptáci. Obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knížní klub, Praha.

Buschiazzo E, Gemmell NJ (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28: 1040-1050.

Cahlíková R (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oboru PŘF UP v Olomouci).

Campbell NA, Reece JB (2006): Biologie. Computer Press, Brno.

Dearborn DC, Hailer F, Fleischer RC (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* 8: 1399–1401.

del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona.

de Ponte Machado M, Feldheim KA, Sellas AB, Bowie RCK (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics* 10: 1033-1036.

Duffie C, Glenn TC, Hagen C, Parker P (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources* 8: 625-627.

Ellegren H (2004): Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Genetics* 5: 435-445.

Faircloth BC, Ramos A, Drummond H, Gowaty PA (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxii*). *Conservation Genetics* 1: 159-162.

Felix J (1976): Ptáci luk, bažin a vod. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

Fike JA, Devault TL, Rhoades OE (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* 9: 1183-1185.

Flegl J (2009): Evoluční biologie, 2. opravené a rozšířené vydání. Academia, Praha.

Gaisler J, Zima J (2007): Zoologie obratlovců, 2. přepracované vydání. Academia, Praha.

Geraci J, Gaillard M, Bechnet A, Cezilly F, Wattier RA (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.

Gur-Arie R, Cohen CJ, Eitan Y, Shelef L, Hallerman EM, Kashi Y (2000): Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome Research*, 10: 62-71.

Hanzák J (1974): Velký obrazový atlas ptáků. Artia, Praha.

Hanzák J, Hudec K (1963): Světem zvířat. II. díl, 1. část, Ptáci. 1. vyd. Státní nakladatelství dětské knihy, Praha.

Hickman CR, Peters MB, Crawford NG, Hagen G, Glenn TC, Somers CM (2009): Development nad characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* 8: 1439-1441.

Humeau L, Silva DD, Guérin F, Jaquement S, Requier JB, Corre ML (2011): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Phaethon lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources* 11: 418-421.

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.

Chmelařová A (2012): Charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) a pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Iqbal M, Ridwan A, Takari F, Mulyono (2008): Rediscovery of a Milky Stork *Mycteria cinerea* breeding colony in South Sumatra province, Indonesia. *Bird to Watch* 10: 62-66.

Ji YJ, Liu YD, Ding ChQ, Zhang DX (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4: 615-617.

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007): Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.

Kapil R (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations. Dizertační práce (Dep. In: University of North Texas).

Kapil R, Sawyer GM, Preston L, Benjamin RC (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.

Kůs E, Pflieger V (2000): Svět vzácných zvířat na přelomu tisíciletí. Granit, Praha.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982): Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Mercer DM, Haig SM, Mullins TD (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources* 2: 119-121.

Metzgar D, Bytof J, Wills C (2000): Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10: 72-80.

Montgomery S (2013): Shoebill, navštíveno dne 16. 2. 2014 na: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/541385/shoebill>

Morris-Pocock JA, Taylor SA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.

Moxon ER, Wills C (1999): Microsatellites: Agents of evolution? *Scientific American* 280: 72-77.

Neff BD, Gross MR, (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55: 1717-1733.

Němečková (2014): Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu veslonozí a plameňáci u nesyta bílého (*Mycteria cinerea*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.

- Piertney SB, Goostrey A, Dallas JF, Carss DN (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology* 7: 138-140.
- Powel W, Machray GC, Provan J (1996): Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1: 215–222.
- Preston EL (2005): Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Dizertační práce (Dep. In: University of North Texas).
- Primmer CR, Moller AP, Ellegren H (1996): A wide survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.
- Ramel C (1997): Mini- and Microsatellites. *Environmental Health Perspectives* 105: 781-789.
- Riordan J, Gardner MG, Fitch AJ, Johnston GR (2012): Isolation, via 454 sequencing, and characterisation of microsatellites for *Phalacrocorax fuscescens*, the blackfaced cormorant (Aves: Phalacrocoracidae). *Australian Journal of Zoology* 60: 340-342.
- Rousset F (2008): GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- 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.
- Šeda O, Liška F, Šedová L (2005): Aktuální genetika, navštíveno dne 1. 3. 2014 na: <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/>.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros, Praha.
- Taylor SA, Morris-Pocock JA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxi*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151: 525-528.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.
- Veselovský Z (2001): Obecná ornitologie. Academia, Praha
- Zane L, Bargelloni L, Paternello T (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zima J, Macholán M, Munclinger P, Piálek J (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.