

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Michaela Sopko

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů
z řádu brodiví u nesyta afrického
(*Mycteria ibis*)**

Bakalářská práce

Michaela Sopko

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 panu RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval při psaní této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat kolektivu Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Děkuji také ZOO Zlín-Lešná za poskytnutí biologického materiálu.

Souhrn

V této bakalářské práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u nesyta afrického (*Mycteria ibis*) metodou *cross-species* PCR amplifikace.

V teoretické části jsem se věnovala taxonomickému zařazení nesyta afrického. Popsala jsem řád brodiví (Ciconiiformes), čeleď čápoovití (Ciconiidae) a rod nesyt (*Mycteria*). Následovala také kapitola týkající se nesyta afrického. V další části rešerše jsem se věnovala popisu repetitivní DNA. Nejvíce jsem se zabývala mikrosatelity, jejich rozdělením, využitím a hledáním. Poslední část teoretického úvodu jsem věnovala popisu hledání mikrosatelitových lokusů navržených pro druhy z řádů brodiví, potáplice a potápky.

V praktické části jsem se zabírala testováním mikrosatelitových lokusů metodou *cross-species* PCR amplifikace u 6 jedinců nesyta afrického, jehož vzorky krve byly získány ze ZOO Zlín-Lešná. Celkem bylo testováno 219 párů primerů. Z řádů brodiví a potáplice byly testovány všechny dosud nalezené mikrosatelitové lokusy, z řádů potápky a vrubozobí pouze některé vybrané mikrosatelity.

Polymorfní produkt jsem zaznamenala u 63 párů primerů, z nichž 60 bylo původně navrženo pro ptáky z řádu brodiví. 1 polymorfní mikrosatelit pocházel od potáplice lední (řád potáplice) a 2 od kachny divoké (řád vrubozobí). Počet alel se pohyboval od 2 do 8.

Summary

In this bachelor thesis I engaged in search of polymorphic microsatellites in yellow-billed stork (*Mycteria ibis*) by cross-species PCR amplification.

In the theoretical part I dealt with taxonomic classification of the yellow-billed stork. I described the order Ciconiiformes, family Ciconiidae and genus *Mycteria*. Followed by a chapter about yellow-billed stork. In the next part of the research I focused on the description of repetitive DNA. Mainly I dealt with microsatellites, their distribution, use and search. In the last part of the theoretical introduction I focused on description of searching microsatellite loci designed for species of orders Ciconiiformes, Gaviiformes and Podicipediformes.

In the experimental part I engaged in testing their microsatellite loci by cross-species PCR amplification on 6 individuals of yellow-billed stork. These blood samples were obtained from ZOO Zlín-Lešná. Altogether, 219 pairs of primers were tested. For orders Ciconiiformes and Gaviiformes all found microsatellite loci were tested, for the orders Podicipediformes and Anseriformes only some microsatellites were tested.

I detected polymorphic product in 63 primer pairs, 60 of which were originally designed for birds of the order Ciconiiformes, 1 polymorphic microsatellite came from great northern loon (order Gaviiformes) and 2 from mallard (order Anseriformes). Number of alleles ranged from 2 to 8.

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíle práce	9
3. Literární přehled.....	10
3.1 Řád brodiví	10
3.1.1 Čeleď čápovití.....	11
3.1.1.1 Rod nesyť	13
3.1.1.1.1 Nesyť africký	13
3.2 Repetitivní DNA	15
3.2.1 Rozptýlená repetitivní DNA	15
3.2.2 Tandemově uspořádaná repetitivní DNA	16
3.2.2.1 Satelity	16
3.2.2.2 Minisatelity	16
3.2.2.3 Mikrosatelity.....	17
3.3 Hledání nových mikrosatelitů	18
3.4 Mikrosatelity známé u řádu brodiví.....	19
3.5 Mikrosatelity známé u řádu potáplice.....	25
3.6 Mikrosatelity známé u řádu potápky	25
4. Materiál a metody	27
4.1 Biologický materiál.....	27
4.2 PCR amplifikace DNA	27
4.3 Zpracování PCR produktů	31
4.3.1 Příprava polyakrylamidového gelu	31
4.3.2 Elektroforetická separace, příprava a nanášení vzorků	32
4.3.3 Vizualizace výsledků	33
4.3.4 Hodnocení výsledků	34
4.4 Použité chemikálie	34
4.5 Použité roztoky	36
4.6 Laboratorní přístroje	38
5. Výsledky.....	39
6. Diskuze.....	50
7. Závěr	66
8. Seznam použitých zkratek	68
9. Seznam literatury.....	69

1. Úvod

Nesyt africký (*Mycteria ibis*), který patří do řádu brodiví, je častým chovancem zoologických zahrad. Pro tento druh nejsou dosud známy markery pro testování paternity jednotlivých mláďat. Data týkající se paternity pocházejí pouze z pozorování etologie těchto ptáků.

Ve své bakalářské práci se budu zabývat hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů u tohoto druhu, které by v budoucnosti mohly sloužit pro určování paternity mláďat. Pro testování budu používat metodu *cross-species* PCR amplifikace, při které budu využívat všechny dosud nalezené mikrosatelity z řádu brodiví (Ciconiiformes) a z řádu potáplice (Gaviiformes), dále pak některé vybrané mikrosatelity z řádů potápky (Podicipediformes) a vrubozobí (Anseriformes).

2. Cíle práce

- Shromáždění dostupných literárních zdrojů
- Zpracování rešerše na dané téma
- *Cross-species* PCR amplifikace veškerých popsáných mikrosatelitů z řádů brodiví (Ciconiiformes) a potáplice (Gaviiformes) a vybraných mikrosatelitů z řádů potápky (Podicipediformes) a vrubozobí (Anseriformes) u nesyta afrického (*Mycteria ibis*)

3. Literární přehled

3.1 Řád brodiví

Řád brodiví (Ciconiiformes) je tvořen pěti čeleděmi: volavkovití (Ardeidae), ibisovití (Threskiornithidae), čápoovití (Ciconiidae), kladivoušovití (Scopidae) a člunozobcovití (Balaenicipitidae), do kterých je zařazeno 113 druhů rozšířených po celém světě s výjimkou polárních oblastí. V České republice se vyskytuje třináct druhů ze tří čeledí, hnízdí zde ale jen deset druhů (Šťastný *et al.*, 1998).

Do řádu brodiví patří ptáci středního až velkého vzrůstu. Charakteristickým znakem většiny z nich jsou dlouhé nohy, dlouhý štíhlý krk a silný zobák, což jsou adaptace k lovu nebo sbírání potravy při brodění v mělké vodě. Mezi další významné znaky zástupců tohoto řádu patří nízko nasazený a dobře vyvinutý palec (Šťastný *et al.*, 1998). I když jsou nohy brodivých dlouhé, nepoužívají je k běhu, ale pohybují se pomalým krokem. Jakmile přecházejí, vzlétnou (Hudec *et* Černý, 1972). Ptákům z řádu brodiví obvykle chybí vole, mají třídílný žaludek a samci mohou mít rudimentární penis. Brodiví výborně létají, využívají hlavně proudy vznikající při oteplování vzduchu nad pevninou – tzv. statické plachtění (Gaisler *et* Zima, 2007). Při letu mají brodiví vždy natažené nohy. Volavkovití létají s esovitě prohnutým krkem a hlavou přitaženou k lopatkám, čápoovití a ibisi s krkem nataženým dopředu (Hudec *et* Černý, 1972). Zobák má většinou tvar štíhlé ostré harpuny, může být ale v důsledku adaptace na způsob lovu a sběru potravy pozměněn nebo upraven (Šťastný *et al.*, 1998).

V opeření se často vyskytují holá místa nebo různé výrůstky; často je možné pozorovat ozdobná pera na hlavě nebo na krku. Obě pohlaví jsou zpravidla stejně zbarvená. Samice bývají menší a mají méně vyvinutá ozdobná pera. Mláďata ale mohou vypadat velmi odlišně (Šťastný *et al.*, 1998).

Zvukové projevy brodivých jsou většinou hlasité, proto je velmi typická trvalá zvuková kulisa na hnízdní kolonii (Šťastný *et al.*, 1998). Hlasový orgán je u brodivých v různé míře zakrnělý, proto je nedostatek hlasu zejména u čápoovitých nahrazován klapáním zobáku. Nejvýraznější hlasové projevy pak mají volavkovití (Hudec *et* Černý, 1972).

Všichni zástupci řádu brodiví jsou masožravci. Většinou loví ryby, žáby a další obojživelníky, nebo chytají hmyz ve vodě a jejím okolí. U tohoto řádu se setkáváme s několika strategiemi lovu. Volavky a bukači vyhledávají kořist pomocí ostrého zraku.

Dokáží stát nehnutě na místě několik hodin, dokud se kořist nepřiblíží na dosah. Ibisí a kolpíci loví kořist v bahnitě vodě pomocí velmi citlivého zobáku. Čápi hledají potravu nejčastěji na zemi, kdy kráčejí pomalu trávou či bažinou a chytají drobné živočichy, které vyrušili. Některé druhy, jako například marabuové, krouží vzduchem podobně jako supi a hledají zdechlíny (Burnie, 2008).

Ačkoliv tyto ptáci loví samotářsky, většina jich hnízdí ve skupinách. Většina druhů hnízdí na stromech (Burnie, 2008). Hnízda jsou zpravidla poměrně velká a jsou vybudována z větví a klacíků. Druhy obývající takováto hnízda v nich hnízdí i několik let a stále je přistavují. Druhy obývající rákosiny, si stavějí zpravidla každý rok hnízda nová, a to z rákosových stébel na přelámaném rákosu a orobinci (Hudec *et* Černý, 1972). Hnízda brodivých se také vyskytují i na skalách a stavbách (Šťastný *et al.*, 1998). Vejce jsou skoro u všech druhů brodivých neskvrnitá. Mláďata jsou krmivá, líhnou se vidoucí a vyznačují se rychlým růstem. Oba rodiče přinášejí mláďatům potravu, kterou vyvrhují do hnízda. U volavkovitých je potravu zprvu vyvrhována mláďatům přímo do zobáku (Hudec *et* Černý, 1972). Mláďata jsou plně vzletná od jednoho měsíce do 115 dnů, mláďata bukáčků však vylézají z hnízda už kolem desátého dne, kdy ještě neumějí létat. Pohlavní dospělosti se dožívají mezi prvním a pátým rokem. Velké druhy řádu brodivých se mohou dožít vysokého věku (Šťastný *et al.*, 1998).

Řád brodiví je rozšířen po celé Zemi s výjimkou polárních oblastí. Hlavním místem výskytu jsou tropické oblasti, v chladnějších pásmech se vyskytuje méně jedinců, kteří zpravidla podstupují dlouhé tahy na zimoviště (Šťastný *et al.*, 1998).

Velký počet zástupců tohoto řádu je na seznamu kriticky ohrožených druhů. Jen velmi málo zástupců se dokázalo přizpůsobit změnám, které v krajině způsobil člověk. Příkladem je volavka rusohlavá (*Bubulcus ibis*), která našla nová loviště na pastvinách a rýžových polích (Burnie, 2008).

3.1.1 Čeled' čápovití

Čeled' čápovití (Ciconiidae) je velmi dobře definovaná skupina, která se vyskytovala již na začátku třetihor. Je dělena do tří tribů. Tribus Mycterini se skládá z rodu nesyť – *Mycteria* (obsahuje čtyři druhy) a zejzob – *Anastomus* (obsahuje dva druhy). Tito ptáci jsou charakterističtí poměrně malým tělem, životem v koloniích a zobákem specializovaným k lovu kořisti. Tribus Ciconiini zahrnuje sedm druhů rodu čáp – *Ciconia*. Jedná se o čápy žijící samotářsky nebo v koloniích. Mají univerzální

zobák, který je vyhovující pro lovení různých druhů kořisti. Tribus Leptoptilini obsahuje dva druhy rodu čáp – *Ephippiorhynchus*, jeden druh rodu jabiru – *Jabiru* a tři druhy rodu marabu – *Leptoptilos*. Tito ptáci mají velké tělo a masivní zobák, který je u některých druhů specializovaný pro určitý druh kořisti. Zatímco druhy rodu *Leptoptilos* žijí v koloniích, druhy rodů *Ephippiorhynchus* a *Jabiru* jsou samotářské (del Hoyo *et al.*, 1992).

Čápoovití jsou ptáci středního až velkého vzrůstu s dlouhým zobákem, krkem a nohama. Samci bývají o trochu větší než samice. Tempo chůze čápoovitých je pomalé, ale na krátké vzdálenosti jsou schopni se rychle vrhnout pro kořist (del Hoyo *et al.*, 1992). Dlouhé nohy jsou více než do poloviny holeně neopeřené a mají slabě vyvinutý palec (Hudec *et* Černý, 1972). Křídla těchto ptáků jsou široká a dlouhá. Čápoovití skvěle plachtí, často vysoko (Šťastný *et al.*, 1998). Na této technice letu jsou závislí, protože obvykle nemají výdrž nezbytnou pro trvalé mávání křídly. Nelétají v žádných formacích, a to ani na krátké vzdálenosti, ani při migraci. Peří je zbarveno do černé, černo-šedé a bílé barvy. Mláďata se zbarvením liší – jejich opeření je šedé nebo hnědé. K výměně peří na zbarvení dospělců dochází kolem druhého až čtvrtého roku (del Hoyo *et al.*, 1992).

Všechny druhy čápoovitých jsou výhradně masožravé. Jejich typickou potravou jsou malé ryby, žáby, hmyz a malí hlodavci. Některé druhy se specializují na různé druhy kořisti. Příkladem mohou být zástupci rodu *Mycteria*, kteří se specializují na malé a středně velké ryby, žáby, korýše a vodní hmyz. Obecně preferují lovení v mělké vodě s velkou koncentrací ryb (del Hoyo *et al.*, 1992).

Čápoovití hnízdí na stromech nebo vyvýšených místech (Šťastný *et al.*, 1998). U samostatně hnízdících druhů mohou žít jedinci spolu v páru několik let, kdežto koloniální druhy tvoří každý rok nové páry. Na stavbě nebo opravě hnízda se podílejí obě pohlaví. Samec většinou nosí stavební materiál, který samice ukládá na místo. Páření probíhá často během stavění hnízda. Do hnízda kladou obvykle 3 – 5 vajec. Nidikolní mláďata se líhnou asynchronně. Oba rodiče nosí mláďatům potravu, kterou pokládají na dno hnízda. V několika prvních týdnech spotřebují mladí čápoovití enormní množství potravy (del Hoyo *et al.*, 1992).

Čápoovití jsou docela přizpůsobiví, co se týče prostředí. Jejich typickými stanovišti jsou bažiny, močály, okraje rybníků, zaplavené louky a pastviny (del Hoyo *et al.*, 1992). Většina čápoovitých žije v tropických oblastech. Ti, kteří obývají chladnější území, se na zimu stěhují do teplých krajín (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.1.1 Rod nesyt

Rod nesyt (*Mycteria*) zahrnuje čtyři druhy velkých tropických čápů, kteří žijí v Americe, Africe a jižní a jihovýchodní Asii (Anonymous, 2011). Druhem žijícím v Americe je nesyt lesní (*Mycteria americana*). Vyskytuje se na jihovýchodě Spojených států amerických (kde je označen jako ohrožený druh), v Mexiku, Střední a Jižní Americe (Tomassulo-Seccomandi *et al.*, 2003). Dalším druhem patřícím do tohoto rodu je nesyt indomalajský (*Mycteria leucocephala*), který se vyskytuje na indickém subkontinentu (Urfi *et* Kalam, 2006). Druhým druhem žijícím v Asii je nesyt bílý (*Mycteria cinerea*). Obývá oblasti severního Vietnamu, Srí Lanku, Kambodžu, Malajsii a Indonéské ostrovy, a to konkrétně Sumatru, Jávu a Sulawesi (del Hoyo *et al.*, 1992). Posledním druhem, který patří do rodu nesyt je nesyt africký (*Mycteria ibis*), o němž pojednává následující kapitola.

Nesyt africký byl dříve spolu s dalšími nesytami řazen do rodu *Tantalus* nebo *Ibis*. Jediným zástupcem rodu *Mycteria* byl původně jen nesyt lesní (*Mycteria americana*). Díky dříve aktuálnímu anglickému pojmenování „*wood ibises*“ byli nesyti zaměněni se zástupci čeledi ibisovití (Threskiornithidae). Navenek se této čeledi podobají, ale jejich chování a několik strukturních znaků jsou typické pro čápovitě a jsou zcela odlišné od všeho, co bylo nalezeno u ibisovitých (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.1.1.1.1 Nesyt africký

Nesyt africký je 95 – 105 cm velký pták, jehož rozpětí křídel je 150 – 160 cm (del Hoyo *et al.*, 1992; Svensson *et* Grant, 2004). Má dlouhý žlutý zobák, který je mírně zakřivený. Jeho čelo a tváře jsou holé, kůže hlavy má oranžovo-červenou barvu. Opeření je bílé barvy, na krku a zadní části hlavy může být peří trochu našedlé. Bílé zbarvení je prostoupeno narůžovělými nebo načervenalými špičkami některých per, a to zejména v období páření, kdy obecně dochází k intenzivnějšímu zbarvení – zejména zobáku, holých částí hlavy a nohou. Pera křídel a ocasu mají černou barvu. Nohy jsou červené (Brown *et al.*, 1993). Samec je obvykle větší, obě pohlaví jsou téměř stejně zbarvená (Burnie, 2008). Mláďata jsou šedo-hnědá, mají šedavě žlutý zobák, nevýraznou oranžovou tvář a nahnědlé nohy. Pera křídel a ocasu mají tmavě hnědou barvu (Brown *et al.*, 1993).

Typickou kořistí nesytů afrického jsou žáby, malé ryby, vodní hmyz, červi a korýši (viz obrázek č. 1). Loví v mělkých vodách se zobákem ponořeným ve vodě.

Zobák je ve vodě většinou mírně otevřený. Někdy také při lovu míchá jednou nohou spodní vrstvu bláta nebo používá křídlo k zastínění vody. Jakmile se kořist přiblíží, dochází k velmi rychlému zaklapnutí zobáku a chycení kořisti. Polapenou kořist často polyká ještě živou. Lovení je založeno na adaptaci zobáku, který je velice citlivý na dotek, kořist totiž nebývá v kalné vodě viditelná. Úspěšnost této strategie lovu se ukazuje i tím, že nesyt africký trávník lovením jen krátkou část dne (Brown *et al.*, 1993).



Obrázek č. 1: Nesyt africký s kořistí (foto: Stanislav Novotný).

Hnízdí v koloniích, často s dalšími brodivými, jako jsou volavky, a veslonohými, jako jsou kormoráni. Hnízda staví obvykle na vrcholech stromů, nejčastěji na vysokých akáciích a baobabech. Na stavbě hnízda se podílejí obě pohlaví; stavba trvá 7 – 10 dní. Každý rok staví nové, celkem malé, hnízdo z větví, rákosu a vodních rostlin (Brown *et al.*, 1993). Klade většinou dvě až tři vejce, vzácněji čtyři. Doba inkubace je cca 30 dní (del Hoyo *et al.*, 1992). Na vejcích sedí střídavě oba rodiče, a to v dlouhých intervalech. Mláďata se líhnou v intervalech dvou nebo více dnů a zpočátku vyžadují nepřetržitou péči. Dokud nejsou alespoň částečně opeřená, sedí s nimi dospělí v hnízdě a chrání je proti slunečnímu svitu. Mláďata jsou krmena potravou vyvrhovanou rodiči do hnízda, pokud jsou však extrémně hladová, berou si potravu přímo ze zobáků rodičů. Péče o potomky se snižuje po cca třech týdnech. Hnízdo opouštějí již bez pomoci rodičů (Brown *et al.*, 1993). Sexuální dospělosti dosahují nejdříve ve třetím roce života. Nejdelší doba života byla zaznamenána u jedince chovaného v zajetí; tento jedinec žil více než 19 let (del Hoyo *et al.*, 1992).

Nesyt africký obývá okraje velkých řek a jezer, bažiny, rýžová pole, laguny a pobřeží (Burnie, 2008). V západní Africe hnízdí někdy také ve městech (del Hoyo *et al.*, 1992). Přesuny jsou pouze lokální, ne na dlouhé vzdálenosti. Trvale se vyskytuje v Zimbabwe, Zambii a na většině území tropické Afriky, roztroušeně v palearktické Africe. V západní Africe provádí pravidelné migrace, kdy v období sucha odlétá na jih (Brown *et al.*, 1993).

Tento druh není globálně ohrožen, jelikož počet jedinců je, možná kromě jižní Afriky, stabilní (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.2 Repetitivní DNA

Genom prokaryot i eukaryot tvoří kódující a nekódující DNA. U prokaryot je na rozdíl od eukaryotických genomů nekódujících úseků DNA málo. Jedná se většinou o regulační sekvence, jako jsou promotory. V genomech eukaryotních organismů včetně člověka se nachází značné množství DNA, která nekóduje funkční ani strukturní produkt. Tato nekódující DNA se skládá částečně z intronů (nacházejících se uvnitř genů), většina je však tvořena repetitivní DNA, která se obvykle nevyskytuje uvnitř genů (Campbell *et al.*, 2006). Repetitivní DNA se skládá ze sekvencí nukleotidů, které se v genomu nacházejí v mnoha kopiích (Šeda *et al.*, 2005). Repetice mohou být rozděleny do dvou typů, a to podle toho, zda jsou v genomu rozptýleny nebo seskupeny (satelitní DNA) (Bennett, 2000).

3.2.1 Rozptýlená repetitivní DNA

Úseky rozptýlené repetitivní DNA se nacházejí roztroušeně po celém genomu a u eukaryot tvoří jeho značnou část. Jeden úsek má délku 100 až 1000 párů bází. Tyto úseky si jsou podobné, ale ne zcela identické (Campbell *et al.*, 2006). Většina rozptýlené repetitivní DNA vzniká procesem transpozice, pro který je třeba enzym transpozáza. Ten umožňuje přesouvání transponovatelných úseků DNA (transpozonů) v genomu (Šeda *et al.*, 2005). Existuje mnoho skupin rozptýlené repetitivní DNA, z nichž největší jsou krátké (SINEs – *short interspersed nuclear elements*) a dlouhé (LINEs – *long interspersed nuclear elements*) rozptýlené jaderné elementy (Bennett, 2000).

3.2.2 Tandemově uspořádaná repetitivní DNA

V tandemově uspořádané repetitivní DNA se opakující se identické nebo téměř identické úseky (tzv. jednotky repetice) nacházejí v řadě za sebou (Šeda *et al.*, 2005). Podle délky jednotky repetice se tandemově repetitivní DNA dělí na tři skupiny, a to na satelity, minisatelity a mikrosatelity (Bennett, 2000).

3.2.2.1 Satelity

Jako první byly objeveny satelity, které dostaly své pojmenování podle vzhledu této DNA po centrifugaci v hustotním gradientu. Satelity se jeví jako samostatné (satelitní) proužky v centrifugační zkumavce, které jsou odděleny od zbylé DNA (Bennett, 2000; Šeda *et al.*, 2005). Jednotka repetice satelitů je obvykle dlouhá až 300 bp a vyskytuje se v tisíci až deseti milionech kopiích (Tautz, 1993). V lidském genomu se satelitní DNA vyskytuje v heterochromatinu, a to zejména v centromerách; není tudíž transkribována (Bennett, 2000).

3.2.2.2 Minisatelity

Minisatelity mají kratší jednotku repetice, která je dlouhá 6 až 100 bp (Vergnaud *et Denoeud*, 2000). Délka minisatelitů se pohybuje od 100 bp do 20 kbp. Minisatelity se dělí do dvou skupin. První z nich jsou minisatelity známé jako telomerické, které se skládají z 10 – 15 kbp opakujících se sekvencí o délce šesti nukleotidů; nejčastěji se jedná o sekvenci TTAGGG. Tyto sekvence vznikají působením enzymu zvanému telomeráza. Druhým typem minisatelitů je hypervariabilní minisatelitní DNA, neboli VNTRs (*variable number tandem repeats*). Základní jednotka opakování může být dlouhá 6 až více než 50 bp (Bennett, 2000). Tento typ minisatelitů je obvykle vysoce polymorfní, co se týče počtu opakování jednotky repetice (Šeda *et al.*, 2005). Mutační rychlost VNTRs je až 10^{-2} na gametu a generaci, v populaci se tudíž vyskytuje obrovské množství alel. U některých minisatelitů může heterozygotnost v populaci dosahovat až více než 99 % (Zima *et al.*, 2004). VNTRs proto mohou být využity jako genetické markery (Šeda *et al.*, 2005).

3.2.2.3 Mikrosatelity

Termín „mikrosatelity“ je pojem označující tandemově uspořádanou repetitivní DNA, jejíž jednotka repetic je 1 – 6 bp. (Tóth *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2002; Christiakov *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006). Celkem obsahují 20 až několik stovek bází (Christiakov *et al.*, 2006). Díky své struktuře a tandemovému uspořádání se mikrosatelity nazývají také SSRs (*simple sequence repeats*) nebo STRs (*short tandem repeats*) (Zima *et al.*, 2004). Mikrosatelity byly nalezeny v genomech všech dosud analyzovaných organismů (Hancock, 1999; Zima *et al.*, 2004). Jsou přítomny v kódujících i nekódujících částech genomu a obvykle vykazují vysoký délkový polymorfismus (Zane *et al.*, 2002).

Mikrosatelity se podle délky jednotky repetic dělí na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové (Tóth *et al.*, 2000). V lidském genomu se nejčastěji vyskytuje sekvence poly(A)/poly(T), která je ale v PCR reakci velmi nestabilní, tudíž není vhodná pro mapování genomu a populační studie (Hancock, 1999; Zima *et al.*, 2004). Poly(A)/poly(T) sekvence se obecně vyskytuje mnohem častěji než sekvence poly(C)/poly(G) (Tóth *et al.*, 2000). Většina, tedy 30 – 67 % mikrosatelitů, se skládá z dinukleotidových repetic (Christiakov *et al.*, 2006). V genomu obratlovců a hmyzu převažuje jednotka repetic AC, druhým nejčastějším motivem je potom AT. Motivy trinukleotidových repetic jsou u všech obratlovců bohaté na guanin a cytozin. (Tóth *et al.*, 2000; Christiakov *et al.*, 2006). Nejčastěji se vyskytujícími trinukleotidovými repeticemi jsou motivy CAG a AAT (Hancock, 1999; Zima *et al.*, 2004). Trinukleotidové mikrosatelity se na rozdíl od di- a tetranukleotidových vyskytují často v kódujících částech genomu. Při zvýšení počtu jednotek repetic dochází proto k neurodegenerativním a neuromuskulárním onemocněním, mezi které se řadí Huntingtonova choroba, syndrom fragilního X a myotonická dystrofie (Christiakov *et al.*, 2006). Tetranukleotidové mikrosatelity jsou obecně bohaté na G a C. Existují ale výjimky, mezi které patří repetic AAGG, která představuje druhý nejčastější motiv repetic u savců. Pentanukleotidové repetic jsou naopak bohaté na adenin a thymin, nejčastějším motivem u primátů je AAAAC. Hexanukleotidové repetic se u obratlovců vyskytují převážně v exonech a u bezobratlých převyšují svým počtem tetranukleotidové repetic (Tóth *et al.*, 2000).

Mikrosatelity lze dělit nejen podle délky jednotky repetic, ale také podle typu opakování sekvence, a to na dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené. V případě

dokonalých mikrosatelitů není sekvence repetice přerušena. Příkladem dokonalého mikrosatelitu je TATATATATATATA. Mezi nedokonalé mikrosatelity patří repetice obsahující bázi, která nenáleží k základnímu motivu (např. TATATACTATATA). Podobným případem jsou mikrosatelity přerušené, které ale obsahují takových bází více (např. TATATAACGTGTATATA). Složený mikrosatelit je pak tvořen dvěma repeticemi, nacházejícími se vedle sebe (např. TATATATATAGTGTGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

Klíčovou vlastností mikrosatelitů je vysoká mutabilita, a tudíž vysoká variabilita v populaci. Proto je možné je použít jako molekulární markery. Mutační rychlost mikrosatelitů je odhadována na $10^{-2} - 10^{-6}$ na lokus a generaci (Christiakov *et al.*, 2006). Mezi mechanismy, které se podílejí na vzniku mutací mikrosatelitů patří sklouznutí DNA polymerázy při replikaci nebo reparaci DNA a nerovnoměrný crossing-over. Při sklouznutí DNA polymerázy dochází ke vzniku smyček na původním nebo nově syntetizovaném vlákně. V důsledku toho dochází ke zvýšení nebo snížení počtu repetic. Při nerovnoměrném crossing-overu může dojít k větší změně počtu repetic než v předchozím případě. Dochází ke ztrátě repetic na jednom z homologních chromozomů a jejich vložení na druhý chromozom (Oliveira *et al.*, 2006).

Mikrosatelity představují vhodné genetické markery, a to díky tomu, že se hojně vyskytují, jsou kodominantní a vysoce polymorfní (Bennett, 2000). Využívají se v molekulární epidemiologii a patologii, populační a konzervační genetice, při genetickém mapování a identifikaci jedinců (Christiakov *et al.*, 2006).

3.3 Hledání nových mikrosatelitů

Mikrosatelity se v posledních dvaceti letech staly jednou z nejpoužívanějších tříd genetických markerů v populačních studiích. Hlavními faktory limitujícími širší využití mikrosatelitů je skutečnost, že mikrosatelitové primery nelze použít univerzálně (Primmer *et al.*, 2005). U druhů, které jsou zkoumány poprvé, je zpravidla nutné nalézt primery *de novo*, a to proto, že většina mikrosatelitových lokusů se nachází v nekódujících oblastech genomu, kde je frekvence nukleotidových substitucí výrazně vyšší než v kódujících oblastech (Zane *et al.*, 2002; Zima *et al.*, 2004). Pro amplifikaci mikrosatelitů je však možné použít primery blízké příbuzného druhu. Bylo prokázáno, že úspěšnost této tzv. *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů je v přímém vztahu s evoluční příbuzností zkoumaného a zdrojového druhu (Primmer *et al.*, 2005).

Izolace mikrosatelitů *de novo* spočívá v rozštěpení genomické DNA, a to pomocí restričních enzymů nebo ultrazvuku. Z takto naštípané DNA jsou vybrány fragmenty o velikosti 300 – 700 bp, které jsou ligovány do plazmidových vektorů. Následuje transformace vektorů do bakteriálních buněk a namnožení klonů. Pomocí Southern blottingu a následné hybridizace značené sondy dochází ke zjištění, zda tyto klony obsahují mikrosatelitovou sekvenci. Pokud ano, jsou poté použity pro navržení primerů. Následně dochází k provedení PCR, hodnocení, zda PCR proběhla a zda je nalezený mikrosatelit monomorfní nebo polymorfní. V případě polymorfních mikrosatelitů jsou dále specifikovány jejich vlastnosti (Zane *et al.*, 2002).

Protože hledání mikrosatelitových lokusů *de novo* je velice finančně a časově náročné, je často využívána již zmíněná metoda *cross-species* PCR amplifikace. (Galbusera *et al.*, 2000). Tato metoda se využívá především ve fylogenetických studiích u ptáků (Galbusera *et al.*, 2000; Primmer *et al.*, 2005).

3.4 Mikrosatelity známé u řádu brodiví

Veškeré existující mikrosatelity u ptáků řádu brodiví byly popsány u druhů z čeledí čápoovití, ibisovití a volavkovití.

Čápoovití

První mikrosatelitové lokusy byly u **nesyta lesního** (*Mycteria americana*) nalezeny již v roce 1999. DNA 136 jedinců starých 3 – 6 týdnů byla získána z krve. Genomická DNA 67 jedinců byla štěpena restriční endonukleázou *Hinf*I a získané fragmenty byly separovány v 0,8% agarózovém gelu. Následně byly přeneseny na nylonovou membránu, kde byly pomocí hybridizace se značenou sondou detekovány fragmenty obsahující mikrosatelitové sekvence. Ty byly poté izolovány a osekvenovány. Celkem byly navrženy 4 páry primerů (van den Bussche *et al.*, 1999).

Další mikrosatelitové lokusy pro nesyta lesního byly publikovány v roce 2003. DNA byla získána z krve pomocí fenol-chloroformové metody. Následně byla štěpena endonukleázou *Hae*III a ligována se SuperSNX linkery. Poté se fragmenty DNA podrobily denaturaci a hybridizaci s biotinylovanými oligonukleotidy, díky nimž mohly být ukotveny na streptavidinem potažené paramagnetické částice. Eluovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR, produkty byly vloženy do vektoru a transformovány do kompetentních buněk *Escherichia coli*. Rekombinované klony byly vybrány pomocí

modrobílé selekce, následně byly amplifikovány a sekvenovány. Bylo navrženo 24 párů primerů, které byly testovány na jedincích nesyta lesního pocházejících z různých kolonií. Z těchto 24 lokusů poskytovalo 11 polymorfni produkt. Genotypizace pro tyto lokusy proběhla u 31 jedinců nesyta lesního (Tomassulo-Seccomandi *et al.*, 2003).

Dalším druhem, u něhož byly nalezeny mikrosatelitové lokusy, je **čáp bílý** (*Ciconia ciconia*). DNA byla izolována z tkáně jediného jedince. Genomická DNA byla štěpena restriční endonukleázou *MseI* a na výsledné fragmenty byly ligovány adaptéry. Pomocí série PCR amplifikací a klonování díky superkompetentním buňkám *Escherichia coli* bylo nalezeno 154 tandemových repetit. Pomocí programu Primer3 bylo navrženo 57 sad primerů. Z tohoto počtu bylo pouze 7 lokusů variabilních. Primery pro variabilní lokusy byly následně kombinovány s primery navrženými pro nesyta lesního v multiplex PCR. Analýza 30 jedinců poskytla celkem 13 polymorfni mikrosatelitových lokusů (Shephard *et al.*, 2009). Pro čápa bílého bylo ještě nalezeno 6 mikrosatelitových lokusů, ze kterých byly 4 lokusy polymorfni a zároveň hodnotitelné (Segelbacher, osobní sdělení).

Genomická DNA **čápa východního** (*Ciconia boyciana*) byla získána z krve 23 jedinců pomocí fenol-chloroformové metody. DNA jednoho jedince byla štěpena restriční endonukleázou *MseI* a spojena s *MseI* AFLP adaptory. Takto upravená DNA byla dvakrát amplifikována a výsledné PCR produkty byly vloženy do pMD19-T vektorů. Tyto vektory byly klonovány v DH5- α kompetentních buňkách. Celkem bylo osekvenováno 110 klonů, které obsahovaly mikrosatelitovou sekvenci. Pomocí programu CID bylo navrženo 14 párů primerů, ze kterých 8 poskytovalo stálý PCR produkt. Tyto primery byly proto vybrány pro další analýzy. Pomocí *cross-species* PCR amplifikace bylo u čápa východního testováno 9 párů primerů navržených pro nesyta lesního. K amplifikaci došlo pouze u 3 z těchto primerů, které zároveň poskytovaly polymorfni PCR produkt (Wang *et al.*, 2011).

Ibisovití

V případě **ibise japonského** (*Nipponia nippon*) se hledáním mikrosatelitů nejdříve zabývali Ji *et al.* (2004). Výsledkem klonování bylo nalezení 229 klonů, které obsahovaly mikrosatelitovou sekvenci. Pro navržení primerů bylo použito 19 mikrosatelitových lokusů. Po rozsáhlých optimalizacích bylo zjištěno, že 18 párů primerů poskytuje PCR produkt. Další analýzy, které byly provedeny ve vysoce

rozlišovacím agarózovém gelu ukázaly, že polymorfní produkty by mohlo poskytovat 13 párů primerů. Ty byly proto testovány na 107 jedincích ibise japonského. Pouze 8 z těchto mikrosatelitových lokusů bylo polymorfních. Těchto 13 párů primerů bylo také testováno na 3 příbuzných jedincích ibise černocephalého (*Threskiornis melanocephalus*). U všech těchto lokusů úspěšně proběhla PCR amplifikace, ale polymorfní produkt byl zaznamenán pouze u 5 z nich (Ji *et al.*, 2004).

Dalšími, kdo se zabývali hledáním mikrosatelitů u ibise japonského, byli He *et al.* (2006). Pro získání genomické DNA použili vzorky krve, svalů a pulp per cekem 36 jedinců. DNA byla naštěpena a ligována s linkery. Ligované fragmenty hybridizovaly s biotinylovanými oligonukleotidy, díky nimž byly ukotveny na streptavidinem potažené magnetické částice. Eluované fragmenty byly pomocí vektoru pGEM-T transformovány do kompetentních buněk. Následovalo sekvenování klonů. Celkem bylo navrženo 18 párů primerů, ale pouze 11 z nich poskytovalo polymorfní produkt (He *et al.*, 2006).

Genomická DNA jednoho jedince **ibise rudého** (*Eudocimus ruber*) byla štěpena restriční endonukleázou *Sau3AI*. Výsledné fragmenty byly elektroforeticky rozděleny v agarózovém gelu. Fragmenty o velikosti 300 – 1000 bp byly purifikovány a ligovány s adaptory. Následně hybridizovaly s biotinylovanými oligonukleotidy uchycenými na streptavidinem potažené částice MagneSphere. Následovala PCR amplifikace a klonování pomocí plazmidu pGEM-T, který byl transformován do bakterie *Escherichia coli*. Rekombinantní klony obsahující repetice byly poté osekvenovány. Z 38 klonů, které obsahovaly mikrosatelitní repetice, bylo pouze 17 vhodných pro navržení primerů. Po provedení PCR amplifikace bylo vybráno 10 lokusů, které poskytovaly polymorfní PCR produkt. Tyto mikrosatelitové lokusy byly genotypovány na 45 jedincích ibise rudého (Santos *et al.*, 2006).

Genomická DNA 51 jedinců **kolpíka růžového** (*Ajaia ajaja*) byla izolována fenol-chloroformovou metodou. Pro nalezení mikrosatelitových lokusů byla použita DNA 5 jedinců, která byla štěpena třemi restričními endonukleázami. Vzniklé fragmenty DNA byly separovány pomocí gelové elektroforézy. Fragmenty o velikosti 300 – 800 bp byly ligovány s linkery a následně amplifikovány. Po denuraci hybridizovaly s biotinem označenými oligonukleotidy obsahujícími mikrosatelitové sekvence. Hybridizované fragmenty byly uchyceny na streptavidinem potažené částice MagneSphere. Následně byly klonovány a transformovány do kompetentních buněk.

Pomocí hybridizace se značenou sondou byly vybrány klony obsahující mikrosatelitovou sekvenci, tyto klony byly poté sekvenovány. Pro navrhování primerů byl použit program Primer3. Po otestování poskytovalo 6 lokusů polymorfnní produkt. Polymorfizmus mikrosatelitu Aaju4 byl určen dvěma alelami, z nichž první (o velikosti 161 bp) byla spojena s chromozomem W, druhá alela o velikosti 200 bp byla spojena s chromozomem Z (Sawyer *et* Benjammin, 2006).

V případě **kolpíka malého** (*Platalea minor*) byla genomická DNA extrahována pomocí metody využívající LiCl. Následně byla štěpena třemi restrikními enzymy. Výsledné fragmenty byly ligovány se SNX linkery a amplifikovány. PCR produkty hybridizovaly s biotinylovanými oligonukleotidy a následně ukotveny na streptavidinem potažené částice Dynalbead M280. Po eluci byly fragmenty opět amplifikovány a následně klonovány. Pomocí hybridizace bylo získáno 315 pozitivních klonů, které byly následně amplifikovány a sekvenovány. Pomocí programu FastPCR 2.3.10 bylo navrženo 64 párů primerů. Úspěšná amplifikace proběhla u 23 párů primerů, a to při testování u 20 jedinců kolpíka malého. Všechny tyto páry primerů byly testovány na jednom jedinci kolpíka růžového, ibise rudého, ibise posvátného (*Threskiornis aethiopicus*), kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a volavky bílé (*Ardea alba*). Silné PCR produkty byly detekovány především u kolpíka růžového, a to v případě 13 párů primerů. O polymorfizmu se ale autoři nezmiňují (Yeung *et al.*, 2009).

Volavkovití

Prvním druhem z této čeledi, pro který byly nalezeny mikrosatelitní sekvence, je **volavka velká** (*Ardea herodias*). Fragmenty genomické DNA (připravené pomocí čtyř restrikních enzymů) obsahující repetitivní sekvence hybridizovaly s biotinylovanými oligonukleotidy, aby mohlo dojít k jejich specifickému vylučování na streptavidinem potažené magnetické částice. Na konce fragmentů byly ligovány linkery, které obsahovaly restrikní místa, díky nimž bylo možné připravit lepivé konce důležité pro vznik rekombinantních molekul pro klonování pomocí plazmidu pUC19. Rekombinanty byly transformovány do bakterií *Escherichia coli*. Klony obsahující repetitivní sekvenci byly amplifikovány a sekvenovány. Celkem bylo získáno 60 sekvencí obsahujících mikrosatelitní repetice. Primery byly ale navrženy pouze pro 28 lokusů, které obsahovaly 9 a více jednotek repetice. Testování těchto párů primerů bylo provedeno u 30 jedinců volavky velké. PCR produkt odpovídající délky poskytl 26

lokusů. PCR produkt, který mohl být spolehlivě hodnocen, poskytlo ale pouze 17 párů primerů. U volavky velké bylo 15 z nich polymorfních, 2 poskytly monomorfní produkt. 9 párů primerů, které byly vyřazeny z dalšího testování, poskytovalo nehodnotitelné PCR produkty. Příčinou byla špatná amplifikace, vznik *stutter* bandů nebo více nehodnotitelných produktů. PCR amplifikace 17 vhodných párů primerů byla provedena také u volavky bílé, volavky popelavé (*Ardea cinerea*) a volavky jihoamerické (*Ardea cocoi*). Většina mikrosatelitních lokusů poskytla PCR produkt, data týkající se polymorfizmu autoři neuvádějí (McGuire *et* Noor, 2002).

V případě **kvakoše nočního** (*Nycticorax nycticorax*) byla genomická DNA získána ze svalů. Mikrosatelitové lokusy byly izolovány a identifikovány pomocí protokolu FIASCO. Pro klonování byl použit vektor pMD19-T, který byl následně vložen do kompetentních buněk DH5- α . Sekvenováno bylo celkem 117 klonů obsahujících mikrosatelitovou sekvenci. Celkem bylo navrženo 11 párů primerů, které byly otestovány na 32 jedincích kvakoše nočního a poskytovaly polymorfni PCR produkt. Těchto 11 párů primerů bylo v rámci *cross-species* PCR amplifikace testováno u 11 druhů z čeledi volavkovití. Mnoho lokusů bylo u jednotlivých druhů úspěšně amplifikováno, údaje týkající se polymorfizmu jednotlivých mikrosatelitových lokusů autoři neuvádějí (Chang *et al.*, 2009).

Podobně jako u mnoha ostatních brodivých byla genomická DNA **volavky červenavé** (*Egretta rufescens*) izolována z krve. Sekvence obsahující mikrosatelitní repetice byly klonovány a následně sekvenovány. Celkem bylo pomocí programu DesignerPCR navrženo 78 párů primerů, které byly testovány na 13 jedincích volavky červenavé. Z celkového počtu lokusů bylo úspěšně amplifikováno pouze 13. Pro tyto páry primerů byly optimalizovány podmínky PCR na 8 jedincích z různých kolonií. Jedna sada primerů byla ovšem vyloučena z důvodu nedostatečné amplifikace napříč všemi vzorky. Výsledkem analýz bylo tedy vyvinutí 12 párů primerů poskytujících polymorfni PCR produkt (Hill *et* Green, 2010).

Pro nalezení mikrosatelitových sekvencí u **volavky žlutozobé** (*Egretta eulophotes*) byla použita genomická DNA jednoho jedince. DNA byla extrahována ze vzorku krve a následně štěpena restriční endonukleázou *Sau3AI*. Fragmenty DNA byly separovány v 1,5% agarózovém gelu. Z gelu byly vyříznuty fragmenty o velikosti 400 – 1000 bp, které byly purifikovány. Na konce těchto fragmentů byly ligovány adaptory. Následovala hybridizace s biotinem značenými oligonukleotidy a ukotvení

hybridizovaných fragmentů na streptavidinem potažené magnetické částice. Eluovaná DNA byla amplifikována, purifikována a následně ligována do pMD 18-T vektoru, který byl poté transformován do buněk *Escherichia coli* DH5- α . Klony obsahující repetice byly poté osekvenovány. Po eliminaci duplikovaných sekvencí bylo pomocí Primer-BLAST navrženo 27 párů primerů pro dané mikrosatelitové lokusy. Tyto primery byly testovány na 20 jedincích volavky žlutozobé. Z celkového počtu 27 párů primerů 9 poskytovalo monomorfní produkt, proto byly tyto primery vyřazeny z dalšího testování. Zbýlých 18 párů primerů poskytovalo produkt polymorfní. Těchto 18 párů primerů bylo dále testováno u volavky stříbřité (*Egretta garzetta*), volavky pobřežní (*Egretta sacra*), volavky bílé (*Egretta alba*), volavky čínské (*Ardeola bacchus*) a volavky rusohlavé (*Bubulbus ibis*). Úspěšnost této *cross-species* PCR amplifikace se pohybovala od 77,78 do 100 %. Údaje o polymorfizmu však autoři neuvádějí (Huang *et al.*, 2010).

Pro volavku žlutozobou byly v roce 2013 publikovány další mikrosatelitové lokusy. Pomocí 454 sekvenování byly z genomické DNA jednoho jedince volavky žlutozobé nalezeny sekvence obsahující mikrosatelitní repetice. Z testování byly vyřazeny dinukleotidové motivy z důvodu vysoké pravděpodobnosti sklouznutí DNA polymerázy během PCR amplifikace, což vede ke vzniku *stutter* bandů, které ztěžují hodnocení analýz. Pomocí softwaru Primer3 byly navrženy primery pro 74 mikrosatelitových lokusů. Tyto páry primerů byly nejprve testovány na 6 jedincích volavky žlutozobé. Z dalšího testování byly poté vyřazeny lokusy, které poskytovaly monomorfní produkt. Zbýlé páry primerů byly následně testovány na 32 jedincích volavky žlutozobé. Dobře hodnotitelný a zároveň polymorfní PCR produkt poskytovalo celkem 23 lokusů. Všechny byly poté v rámci *cross-species* PCR amplifikace testovány u dalších 7 druhů z čeledi volavkovití, a to u volavky bílé, volavky popelavé, volavky čínské, volavky rusohavé, volavky stříbřité, volavky pobřežní a kvakoše nočního. Výsledkem byla velmi úspěšná amplifikace u všech testovaných druhů. Největší míra polymorfizmu byla zaznamenána u volavky stříbřité, u které poskytlo 17 lokusů z celkových 23 polymorfní PCR produkt (Dai *et al.*, 2013).

Posledním druhem z řádu brodiví, pro který byly nalezeny mikrosatelity, je **volavka rusohlavá** (*Bubulcus ibis*). Genomická DNA byla extrahována z krve dvou jedinců tohoto druhu pomocí fenol-chloroformové metody. Následovala hybridizace DNA s biotinylovanými sondami a její uchycení na streptavidinem potažené

magnetické částice. Sekvence, které obsahovaly mikrosatelitové repetice, byly poté klonovány a transformovány do kompetentních buněk. Následovalo sekvenování klonů a návrh primerů pomocí programu Gene Runner 3.05. Navržené primery byly testovány u 35 jedinců volavky rusohlavé. Celkem bylo testováno 32 mikrosatelitových lokusů, z nichž pouze 11 poskytovalo polymorfni produkt. Tyto lokusy byly poté testovány na dalších 8 druzích z čeledi volavkovití. Úspěšnost této *cross-species* PCR amplifikace byla vysoká, míru polymorfizmu však autoři neuvádějí (Campanini *et al.*, 2012).

3.5 Mikrosatelity známé u řádu potáplice

U tohoto řádu byly mikrosatelitní sekvence nalezeny pouze u jednoho druhu, a to u potáplice lední (*Gavia immer*).

Genomická DNA **potáplice lední** byla extrahována z krevních vzorků uchovávaných v PBS pufru. Následně byla DNA naštěpena pomocí tří různých restričních enzymů a ligována s linkery. Poté došlo k hybridizaci s biotinylovanými sondami a uchycení na streptavidinové částice. Zachycená DNA byla amplifikována a následně klonována pomocí vektoru pGEM-T, který byl transformován do kompetentních buněk. Klony s vloženým inzertem byly dále amplifikovány a přítomnost mikrosatelitů byla potvrzena použitím dot blot hybridizací se specifickými sondami. Po nalezení mikrosatelitních sekvencí byly tyto inzerty osekvenovány. K návrhu primerů byl použit program Primer3. Testováním u 83 jedinců potáplice lední získali autoři 7 polymorfni mikrosatelitů (McMillan *et al.*, 2004).

3.6 Mikrosatelity známé u řádu potápky

Hledáním mikrosatelitových lokusů u ptáků z řádu potápky se dosud zabývaly dvě práce. Jedna z nich byla publikována v časopise Molecular Ecology (Sachs *et Hughes*, 1999), druhá měla charakter diplomové práce (Humple, 2009).

Prvním druhem, pro nějž byly nalezeny mikrosatelitové lokusy, je z tohoto řádu **potápka rudokrká** (*Podiceps grisegena*). Pro hledání mikrosatelitních lokusů byla použita DNA extrahovaná z krve pomocí fenol-chloroformové metody. DNA byla štěpena pomocí restriční endonukleázy *DpuII* a vzniklé fragmenty byly klonovány. Následně byly osekvenovány klony obsahující mikrosatelitové sekvence. Navrženo bylo celkem 7 párů primerů, které byly testovány u 87 jedinců potápky rudokrké. Všechny testované lokusy poskytly polymorfni produkt. 6 z nich bylo dále testováno u dalších

5 druhů potápek a jednoho mezidruhového křížence. Těmito druhy byly: potápka černokrká (*Podiceps nigricollis*), potápka žlutorohá (*Podiceps auritus*), potápka americká (*Podilymbus podiceps*), potápka západní (*Aechmophorus occidentalis*), potápka Clarkova (*Aechmophorus clarkii*) a hybrid potápky západní a potápky Clarkovy (*Aechmophorus occidentalis/clarkii*). U většiny druhů došlo k úspěšné amplifikaci 6 nebo 7 lokusů, výjimkou byla potápka americká, u které došlo k úspěšné amplifikaci pouze v případě dvou lokusů. U všech druhů kromě potápky černokrké (všechny lokusy monomorfní), poskytly nejméně 2 lokusy polymorfní produkt (Sachs *et* Hughes, 1999).

Dalším druhem, pro který byly nalezeny mikrosatelitní lokusy, je **potápka západní** (*Aechmophorus occidentalis*). Genomická DNA byla extrahována ze svalů a jater pomocí fenol-chloroformové metody. Celkem bylo zkoumáno 166 sekvencí klonů z knihoven, které autorce připravila společnost GIS (Genetic Identification Services of Chatsworth). Z 69 lokusů, které mohly obsahovat mikrosatelitové repetice bylo vybráno 25, na které byly navrženy primery pomocí programu Primer3. Polymorfní produkt poskytovalo 11 párů primerů. Testování probíhalo u 16 jedinců potápky západní a 16 jedinců potápky Clarkovy, u které poskytly všechny testované lokusy také polymorfní produkt. 11 navržených párů primerů také autorka testovala u dalších 5 druhů, a to u potápky rudokrké, potápky žlutorohé, potápky černokrké, potápky americké a potápky nejmenší (*Tachybaptus dominicus*). Ve své diplomové práci uvádí pouze úspěšnost amplifikace, o polymorfizmu se však nezmiňuje. Největší úspěšnost PCR amplifikace zaznamenala u potápky žlutorohé, u které poskytly všechny testované páry primerů PCR produkt (Humple, 2009).

4. Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Genomická DNA, která byla použita pro praktickou část mé bakalářské práce, byla vyizolována z krve šesti jedinců nesya afrického (*Mycteria ibis*). Vzorky krve byly jedincům odebrány v ZOO Zlín-Lešná. Izolaci genomické DNA z ptačí krve provedl fenol-chloroformovou metodou vedoucí bakalářské práce.

4.2 PCR amplifikace DNA

Amplifikace vyizolované genomické DNA byla provedena vždy s vybraným párem primerů, který byl obsažen v reakční směsi, jejíž složení je uvedeno v tabulce č. 1.

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

Složky PCR mixu	Objem [μ l]
Deionizovaná voda	44,4; 46,4*
Reaction Buffer 10x	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
aTaq DNA polymeráza (5 U/ μ l)	1,0

Většina reakcí probíhala se standardním množstvím MgCl₂ (4,0 μ l). U mikrosatelitu PM2-62 bylo ale toto množství sníženo na polovinu. Rozdíl v objemech MgCl₂ byl kompenzován přidáním odpovídajícího objemu vody do PCR mixu. Hodnoty objemu deionizované vody a roztoku MgCl₂ pro tento mikrosatelitový lokus jsou v tabulce označené hvězdičkou.

Všechny složky PCR mixu byly uchovávány v mrazáku při -20 °C. Po rozmrazení byly zvortexovány a zcentrifugovány. Následně byly pipetovány do 1,5ml mikrozkušavky. PCR mix byl opět zvortexován a zcentrifugován.

Genomická DNA o koncentraci 10 – 50 µg/ml byla uchovávána v lednici. Do šesti 0,2ml PCR zkumavek byl napipetován 1 µl genomické DNA a následně 9 µl PCR mixu.

Poté byly mikrozkušavky vloženy do termocykléru. Amplifikace probíhala podle následujícího časového a teplotního profilu:

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

Základní teplota *annealingu*, na kterou byly otestovány všechny páry primerů, byla 50 °C. Tato teplota byla pro páry primerů, které se jevily polymorfní, dále upravována, a to v rozmezí 44 – 68 °C. Teplota byla zvyšována z důvodu příliš silných produktů, u kterých nebylo možné rozlišit jednotlivé alely. V případě, že testované páry primerů PCR produkt neposkytly, byla teplota snížena. Po úpravě teploty *annealingu* bylo zjištěno, že některé mikrosatelitové lokusy jsou monomorfní, polymorfní mikrosatelity byly poté lépe hodnotitelné.

PCR amplifikace byla provedena s 219 páry primerů. Jelikož byla použita metoda *cross-species* PCR amplifikace, nebyly tyto primery navrženy pro nesyta afrického (*Mycteria ibis*), ale pro jiné druhy z řádů brodiví (Ciconiiformes), potáplice (Gaviiformes), potápky (Podicipediformes) a vrubozobí (Anseriformes). Na rozdíl od mikrosatelitů z řádů potápky a vrubozobí, kde byly testovány jen některé mikrosatelity, byly z řádů brodiví a potáplice testovány veškeré dosud publikované mikrosatelitové lokusy. Z řádu brodiví, do kterého patří i nesyt africký, bylo testováno 192 párů primerů navržených pro 12 druhů. Těmito druhy jsou čáp bílý, čáp východní, ibis japonský, ibis rudý, kolpík malý, kolpík růžový, kvakoš noční, nesyt lesní, volavka červenavá, volavka velká, volavka žlutozobá a volavka rusohlavá. Dále bylo testováno 7 párů primerů primárně navržených pro potápku rudokrku z řádu potápky, 7 párů primerů primárně navržených pro potáplici lední z řádu potáplice a 13 párů primerů navržených pro 4 druhy z řádu vrubozobí, a to konkrétně pro kachnu divokou, kachnu pižmovou, kachnici laločnatou a kajku mořskou. Všechny testované mikrosatelity jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Přehled mikrosatelitových lokusů testovaných u nesyta afrického. V tabulce je uveden řád, zdrojový druh, mikrosatelitový lokus a autor a letopočet 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 1.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitové lokusy	Literární zdroj
Brodiví (Ciconiiformes)	Kolpík růžový (<i>Ajaia ajaja</i>)	Aaju1, Aaju2, Aaju3, Aaju4, Aaju5, Aaju6	Sawyer <i>et</i> Benjamin, 2006
		AajuSEX	Podle Sawyer
	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>)	Wsm03, Wsm08, Wsm09, Wsm13, Wsm14, Wsm17, Wsm18, Wsm19, Wsm20, Wsm23, Wsm24	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</i> Green, 2010
	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</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
Ee04, Ee06, Ee10, Ee17, Ee18, Ee20, Ee22, Ee23, Ee24, Ee26, Ee28, Ee30, Ee33, Ee34, Ee37, Ee41, Ee42, Ee43, Ee44, Ee45, Ee46, Ee50, Ee51		Dai <i>et al.</i> , 2013	

Tabulka č. 2: Pokračování 2.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitové lokusy	Literární zdroj
Brodiví (Ciconiiformes)	Volavka rusohlavá (<i>Bubulcus ibis</i>)	Bi01, Bi08, Bi13, Bi15, Bi18, Bi20, Bi22, Bi26, Bi28, Bi29, Bi30	Campanini <i>et al.</i> , 2012
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
Vrubozobí (Anseriformes)	Kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APH07, APH09	Maak <i>et al.</i> , 2000
		APH08, APH12, APH13, APH16	Maak <i>et al.</i> , 2003
	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

4.3 Zpracování PCR produktů

4.3.1 Příprava polyakrylamidového gelu

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. Malé sklo bylo důkladně omyto vodou a saponátem a vydrhnuto kartáčkem. Poté bylo opláchnuto deionizovanou vodou. Plocha dotýkající se gelu byla osušena, dvakrát ošetřena 96% ethanolem a opět osušena papírovým

ubrouskem. Na tuto plochu bylo následně naneseno molekulární lepidlo. Molekulární lepidlo se nechalo 5 minut schnout. Po uplynutí této doby bylo sklo 4x ošetřeno 96% ethanolem a osušeno.

2. Velké sklo bylo taktéž důkladně omyto a vydrhnuto kartáčkem. Po osušení papírovým ubrouskem byla plocha dotýkající se gelu ošetřena přípravkem odpuzujícím vodu, který se používá na skla automobilů. Přípravek se nechal 5 minut zaschnout. Následně bylo velké sklo dvakrát omyto deionizovanou vodou a vždy důkladně osušeno papírovými ubrousky.
3. Na delší strany velkého skla byly umístěny 0,4 mm silné spacers, na které bylo položeno malé sklo ošetřenou plochou směrem dolů tak, aby se gumové části spacerů těsně dotýkaly malého skla. Pro upevnění skla na spacerech byly použity klipsy.
4. Následně byl připraven polyakrylamidový 6% gel, který byl pomalu vléván mezi obě skla tak, aby nedošlo k vytvoření bublin v gelu.
5. Po vyplnění celého prostoru mezi skly gelem byl mezi skla v místě nalévání vsunut hřebínek, a to rovnou stranou do hloubky asi 0,7 cm. Hřebínek byl upevněn klipsy. Doba polymerizace gelu byla cca 1 hodina.

4.3.2 Elektroforetická separace, příprava a nanášení vzorků

1. Po ztuhnutí gelu byly odstraněny veškeré klipsy, skla s gelem byla důkladně omyta od zbytků polyakrylamidu, osušena a vložena do elektroforetické komůrky, a to stranou s hřebínkem směrem nahoru. V elektroforetické komůrce byla důkladně upevněna pomocí šroubů.
2. Do katodového i anodového prostoru byl nalit 0,5x TBE pufr. Následně byl opatrně vyjmut hřebínek tak, aby nedošlo k poškození gelu. Prostor mezi skly byl od zbytků gelu vyčištěn proudem pufru z injekční stříkačky. Následovalo uzavření katodového i anodového prostoru a připojení elektrod ke zdroji stejnosměrného proudu. Na něm byly nastaveny hodnoty elektrického proudu (150 mA), napětí (3000 V) a výkonu (90 W). Gel byl takto nahříván cca 30 minut.

3. Do mikroskopavek obsahujících PCR produkty bylo přidáno 5 μ l nanášecího pufru. Několik minut před ukončením nahřívání gelu byly tyto vzorky denaturovány v termocykléru po dobu 3 minut při teplotě 94 °C. Po uplynutí doby denaturace byly vzorky okamžitě umístěny do ledové tříště.
4. Během denaturace vzorků bylo ukončeno nahřívání gelu. Prostor mezi skly byl opět vyčištěn pomocí proudu pufru z injekční stříkačky. Do tohoto prostoru byl následně opatrně umístěn hřebínek tak, aby jeho zoubky zasahovaly do gelu do hloubky asi 1 mm.
5. Nanášení 2 μ l vzorků bylo prováděno pomocí osmikanálové pipety do prostorů mezi zoubky hřebínku. Po nanesení všech vzorků byl katodový prostor opět uzavřen. Na zdroji stejnosměrného napětí byla nastavena hodnota výkonu 75 W, hodnoty elektrického proudu a napětí byly stejné jako při nahřívání. Elektroforetická separace trvala 1,5 – 3 hodiny.
6. Během separace byl připraven roztok fix/stop, roztok 1% kyseliny dusičné a vývojka, která byla umístěna do lednice.
7. Po uplynutí doby elektroforézy byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu, následovalo odpojení elektrod a vypuštění pufru z katodového prostoru. Sklo bylo vyjmuto z elektroforetické komůrky. Poté byly odstraněny spacers a malé sklo s přilepeným gelem bylo pomocí nože odděleno od velkého skla. Velké sklo, hřebínek i spacers byly umyty v deionizované vodě a připraveny na další použití. Následující manipulace byly prováděny s gelem přilepeným na malém skle.

4.3.3 Vizualizace výsledků

1. Sklo s gelem bylo vloženo (gelem nahoru) do fotomisky umístěné na třepačce a zalito roztokem fix/stop, který působil 20 minut. Po uplynutí této doby byl fix/stop roztok slit zpět do baňky a uchován pro další použití. Následně bylo sklo s gelem 3x důkladně promyto deionizovanou vodou.
2. Následovalo promývání na třepačce v roztoku 1% kyseliny dusičné, a to po dobu 4 minut. Poté byl roztok vylit a sklo bylo 4x důkladně omyto deionizovanou vodou.

3. Sklo s gelem bylo přeneseno do fotomisky určené pro promývání v roztoku 0,1% dusičnanu stříbrného, do kterého bylo před použitím přidáno 1,2 ml formaldehydu. Roztok se nechal působit 30 minut.
4. Po uplynutí této doby byl roztok AgNO_3 slit zpět do láhve a sklo s gelem bylo vloženo na 5 – 10 sekund do deionizované vody. Následně bylo umístěno na třepačku v příslušné misce a zalito vývojkou. Docházelo k vyvíjení hnědošedých (stříbrem obarvených) proužků PCR produktů. Jakmile byly proužky dostatečně zřetelné, bylo vyvíjení přilitím roztoku fix/stop zastaveno.
5. Následně bylo sklo s gelem umístěno na cca 1 minutu do deionizované vody a poté přemístěno do sušárny. Sušení probíhalo při teplotě 90 °C přibližně 30 minut.
6. Po usušení bylo sklo přeneseno na negatoskop, kde byla vyhodnocena PCR amplifikace jednotlivých mikrosatelitů. Následovalo naskenování gelu do počítače.
7. Poté bylo sklo s gelem ponořeno do roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l, kde došlo k odlepení gelu od skla. Sklo bylo důkladně umyto a připraveno k dalšímu použití.

4.3.4 Hodnocení výsledků

1. Výsledky byly hodnocené softwarem Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.2 (Rousset, 2008). Program Cervus 3.0.6 byl použit pro výpočet heterozygotnosti (získané i očekávané) a srovnání, zda jsou jednotlivé lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze. Pomocí programu Genepop 4.2 bylo hodnoceno, zda jsou některé z mikrosatelitových lokusů ve vazbě.

4.4 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'-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)

4.5 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 zfiltrvat a uložit v temné láhvi ve 4 °C

- **Polyakrylamidový 6% gel:**

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

400 µl 10% roztoku peroxidisíranu 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 AgNO_3 :**
 - 0,8 g AgNO_3
 - doplnit objem deionizovanou vodou na 800 ml
 - před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu
- **Vývojka:**
 - 24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3
 - 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 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- **Roztok 10% peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$:**
 - 1 g peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
 - 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 Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
 - rozpustit v 900 ml deionizované vody, doplnit deionizovanou vodou na 1 l a zfiltrvat

4.6 Laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)
- Elektroforetický zdroj EV 232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy MARK S 622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)
- Mikropipety Finnipipette 0,5 µl až 10 µl (osmikanálová) (Labsystems)
- Mikropipety Finnipipette 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Negatoskop NEGA1 (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 Cyclers (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

V experimentální části své bakalářské práce jsem se věnovala hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 6 jedinců nesyta afrického (*Mycteria ibis*). Tito jedinci jsou chováni v ZOO Zlín-Lešná. Celkem jsem u nesyta afrického testovala 219 párů primerů, které byly původně navrženy pro druhy z řádů brodiví (Ciconiiformes), potáplice (Gaviiformes), potápky (Podicipediformes) a vrubozobí (Anseriformes). Od řádů brodiví a potáplice jsem testovala všechny dosud popsané mikrosatelitové lokusy, v případě řádu potápky a vrubozobí jen některé vybrané mikrosatelitové lokusy.

PCR amplifikací většiny těchto párů primerů vznikl monomorfní produkt. 4 páry primerů neamplifikovaly žádný mikrosatelitový lokus. Polymorfní produkt poskytlo celkem 63 párů primerů, z nichž 60 bylo navrženo pro ptáky z řádu brodiví. Nejvíce polymorfních mikrosatelitových lokusů u nesyta afrického bylo navrženo pro volavku žlutozobou (*Egretta eulophotes*). Jednalo se o 12 lokusů. 9 polymorfních lokusů u nesyta afrického bylo primárně navrženo pro nesyta lesního (*Mycteria americana*), po 7 polymorfních lokusech bylo od čápa bílého (*Ciconia ciconia*) a kolpíka malého (*Platalea minor*), po 5 lokusech poskytly polymorfní produkt primery od čápa východního (*Ciconia boyciana*) a ibise japonského (*Nipponia nippon*), 4 lokusy polymorfní u nesyta afrického byly získány od kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*), 3 polymorfní mikrosatelitové lokusy byly původně navrženy pro volavku červenavou (*Egretta rufescens*) a volavku velkou (*Ardea herodias*), 2 polymorfní mikrosatelity byly získány použitím párů primerů od kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a ibise rudého (*Eudocimus ruber*) a 1 polymorfní mikrosatelitový lokus byl navržen pro volavku rusohlavou (*Bubulcus ibis*). Další 2 polymorfní lokusy byly získány od kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) z řádu vrubozobí a 1 mikrosatelit poskytující polymorfní produkt u nesyta afrického byl navržen pro potáplici lední (*Gavia immer*) z řádu potáplice.

Největší procento získaných polymorfních mikrosatelitů u nesyta afrického bylo původně navrženo pro druhy z čeledi čápovití. Do této čeledi patří také nesyt africký, tudíž lze tvrdit, že výsledek je v korelaci s fylogenetickou vzdáleností nesyta afrického a zdrojových druhů těchto lokusů. Mezi testovanými mikrosatelity bylo také 15 lokusů navržených pro nesyta lesního, z nichž 9 poskytlo polymorfní produkt i u

nesyta afrického. Velkou úspěšnost amplifikace polymorfních produktů jsem u těchto mikrosatelitů očekávala, protože nesyt africký a nesyt bílý patří do stejného rodu.

Otestováním celkem 219 párů primerů u 6 jedinců nesyta afrického jsem našla 63 na sobě nezávislých polymorfních mikrosatelitových lokusů. 11 z nich vykazovalo možnou vazbu na pohlaví. U 3 z nich byla vazba na pohlaví ptáků pozorována také v několika dalších pracích.

8. Seznam použitých zkratek

- A adenin
- bp pár bází (*base pair*)
- C..... cytozin
- DNA..... deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)
- dNTP..... deoxynukleotid trifosfát (*deoxyribonucleotide triphosphate*)
- G guanin
- kbp kilobáze
- LINEs..... dlouhé rozptýlené jaderné elementy (*long interspersed nuclear elements*)
- PCR..... polymerázová řetězová reakce (*polymerase chain reaction*)
- SINEs..... krátké rozptýlené jaderné elementy (*short interspersed nuclear elements*)
- SSRs..... repetice jednoduchých sekvencí (*simple sequence repeats*)
- STRs krátké tandemové repetice (*short tandem repeats*)
- T..... thymin
- T_a..... teplota *annealingu*
- VNTRs..... variabilní počet tandemových repetit (*variable number of tandem repeats*)

9. Seznam literatury

- Anonymous (2011): Yellow-billed stork (*Mycteria ibis*). Navštíveno dne 10. 7. 2014 na <http://www.planetofbirds.com/ciconiiformes-ciconiidae-yellow-billed-stork-mycteria-ibis>.
- Bennett P (2000): Demystified...Microsatellites. *Molecular Pathology* 53, 177 – 183.
- Brown LH, Urban EK, Newman K (1993): The birds of Africa. Vol. 1. Academic Press, London.
- Brown TA: The polymerase chain reaction. In Brown TA (2001): Essential Molecular Biology Volume Two. Oxford University Press, Oxford.
- Burianová E (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce, Depon. in: Knihovna biologických oborů, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Burnie D (2008): Ptáci. Obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha.
- van den Bussche RA, Harmon SA, Baker RJ, Bryan AL, Rodgers JA, Harris MJ, Brisbin IL Jr (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the wood stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 4, 1083 – 1092.
- Cahlíková R (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Diplomová práce, Depon. in: Knihovna biologických oborů, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Campanini EB, Sanches A, Hatanaka T, del Lama SN (2012): Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from cattle egret (*Bulbulcus ibis*) and cross-amplification in other Ardeidae species. *Conservation Genetic Resources* 4, 707 – 709.
- Campbell NA, Reece JB (2006): Biologie. Computer Press, Brno.

- Dai Y, Zhou X, Fang W, Lin Q, Chen X (2013): Development and cross-species transferability of 23 microsatellite markers from the vulnerable Chinese Egret (*Egretta eulophotes*) using 454 sequencing. *Conservation Genetics Resources* 5, 1035 – 1038.
- 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.
- 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.
- Galbusera P, van Dongen S, Matthysen E (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1, 163 – 168.
- Guay PJ, Mulder RA (2005): Isolation and characterization of microsatellite markers in musk duck (*Biziura lobata*: Aves) and their application to other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 5, 249 – 252.
- Hancock JM: Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanism. In: Goldstein DB, Schlötterer C (1999): Microsatellites. Oxford University Press, Oxford.
- He LP, Wan QH, Fang SG, Xi YM (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.
- del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona.

- 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.
- Hudec K, Černý W (1972): Fauna ČSSR, Ptáci 1. Academia, Praha.
- Humple DL (2009): Genetic structure and demographic impacts of oil spills in western and Clark's grebes. Diplomová práce, Depon. in: Sonoma State University, Rohnert Park.
- 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.
- Ji YJ, Liou YD, Ding CQ, Zhang DX (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4, 615 – 617.
- Juračková N (2014): Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u nesyta bílého (*Mycteria cinerea*). Bakalářská práce, Depon. in: Knihovna biologických oborů, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- 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.
- Konrádová D (2013): Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce, Depon. in: Knihovna biologických oborů, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Maak S, Neumann K, von Lengerken G, Gattermann R (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics* 31, 233.

- Maak S, Wimmers K, Weigend S, Neumann K (2003): Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 3, 224 – 227
- 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.
- 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.
- 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.
- Rousset F (2008): GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103 – 106.
- Sachs JL, Hughes CR (1999): Characterization of microsatellite loci for red-necked grebes *Podiceps grisegena*. *Molecular Ecology* 8, 687 – 688.
- Santos MS, Goncalves C, Barbosa MSR, Silva A, Chneider PC (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.
- Stai SM, Huges CR (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics* 34, 387 – 389.
- Svensson L, Grant PJ (2004): Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého východu. Praktická určovací příručka. Svojtka & Co., Praha.
- Šeda O, Liška F, Šedová L (2005): Aktuální genetika, navštíveno dne 2. 7. 2014 na <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/>.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros, Praha.
- Tautz D: Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ (1993) DNA Fingerprinting: State of the Science. Birkhäuser Verlag, Basilej.
- Tomasulo-Seccomandi AM, Schable NA, Bryan AL Jr, Brisbin IL, 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.
- Urfi AJ, Kalam A (2006): Sexual Size Dimorphism and Mating Pattern in the Painted Stork (*Mycteria leucocephala*). *Waterbirds* 29, 489 – 496.
- Vergnaud G, Deneud F (2000): Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Research* 10, 899 – 907.
- 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* 8, 606 – 608.

- Yeung CKL, Hsu YC, Yao YT, Li SH (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.