

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2023**

**Sára Hrabalová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



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

**Bakalářská práce**

**Sára Hrabalová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2023**

**Vedoucí práce: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sára HRABALOVÁ**  
Osobní číslo: **R20699**  
Studijní program: **B1501 Biologie**  
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta afrického (*Mycteria ibis*).**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

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

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Prum, R.O. *et al.* (2015): A comprehensive phylogeny of birds (*Aves*) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
2. Moodley, Y. *et al.* (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046–1058.
3. Kennedy, M. *et al.* (2013): The phylogenetic relationships of the extant pelicans inferred from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 215–222.
4. Bicknell, A.W.J. *et al.* (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's storm-petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, *Aves*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 711–716.
5. Briedl, J. *et al.* (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.

Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Petr Nádvozník, Ph.D.**

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 29. března 2022  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

---

**doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.**  
děkan

---

**prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.**  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 8. dubna 2022



## Bibliografické údaje

<b>Jméno a příjmení autora:</b>	Sára Hrabalová
<b>Název práce:</b>	<i>Cross-species</i> amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta afrického ( <i>Mycteria ibis</i> )
<b>Typ práce:</b>	Bakalářská
<b>Pracoviště:</b>	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
<b>Vedoucí práce:</b>	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce:</b>	2023

### Souhrn:

Ve své bakalářské práci jsem použila *cross-species* PCR amplifikaci u nesyta afrického (*Mycteria ibis*) k hledání polymorfních mikrosatelitů.

V teoretické části jsem se věnovala popisu řádu čápi, čeledi čápoovití, dále charakteristice nesyta afrického, a to především jeho geografickému rozšíření a způsobu života. Dále jsem uvedla vlastnosti mikrosatelitních lokusů obecně, ale i z hlediska jejich polymorfismu u zdrojových druhů z řádu trubkonosí.

V laboratorní části jsem testovala pomocí PCR amplifikace následované elektroforetickou separací v polyakrylamidovém gelu polymorfismus 213 párů primerů u 6 nepříbuzných jedinců nesyta afrického.

Celkem jsem určila jako polymorfních 38 mikrosatelitů, které měly 2–5 alel. Dalších 170 mikrosatelitů bylo monomorfních a 5 neposkytlo žádný produkt.

<b>Klíčová slova:</b>	Nesyt africký, <i>Mycteria ibis</i> , trubkonosí, mikrosatelity, <i>cross-species</i> PCR amplifikace
<b>Počet stran:</b>	60
<b>Počet příloh:</b>	0
<b>Jazyk:</b>	Český

## **Bibliographical identification**

**Author's name and surname:** Sára Hrabalová

**Title:** Cross-species amplification of microsatellites from Procellariiformes in Yellow-billed stork (*Mycteria ibis*)

**Type of thesis:** Bachelor

**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

**Supervisor:** RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

**The year of presentation:** 2023

### **Summary:**

The topic of this bachelor thesis is focused on the search of polymorphic microsatellite loci in Yellow-billed stork using cross-species PCR amplification.

The theoretical part of this thesis deals with the characteristics of the *Ciconia* order and the Ciconiidae family, followed by a description of the Yellow-billed stork, including his geographical distribution, reproduction and way of life. In the following chapters, microsatellites are described in general, but also individual polymorphic microsatellite loci are described in species from the order Procellariiformes.

The experimental part deals with the testing and detection of polymorphism in 6 unrelated individuals of the Yellow-billed stork by using the cross-species PCR amplification and subsequent electrophoretic separation of products with 213 primer pairs.

A polymorphic product gave 38 microsatellites with 2–5 alleles per locus. Another 170 microsatellites were monomorphic and 5 didn't provide any PCR product.

**Key words:** Yellow-billed stork, *Mycteria ibis*, Procellariiformes, microsatellites, *cross-species* PCR amplification

**Number of pages:** 60

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci za použití citovaných literárních zdrojů  
vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D.

V Olomouci dne 28. 7. 2023

.....

Ráda bych poděkovala za vedení a veškerou pomoc při zpracování teoretické i experimentální části mé bakalářské práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat především mé rodině, která mě po celou dobu studia bezmezně podporovala a byla tu se mnou při každém mém kroku. Slovo děkuji patří i mým kolegům z Laboratoře populační genetiky za příjemně uvolněnou atmosféru.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled .....</b>	<b>3</b>
3.1	Řád čápi .....	3
3.2	Systematické uspořádání řádu čápi .....	5
3.3	Nesyta africký .....	6
3.4	Mikrosatelity .....	8
3.5	Polymorfní mikrosatelity od druhů z řádu trubkonosí .....	12
<b>4</b>	<b>Materiál a metody.....</b>	<b>17</b>
4.1	Biologický materiál.....	17
4.2	Seznam použitých chemikálií .....	17
4.3	Seznam použitých roztoků a jejich příprava .....	18
4.4	Seznam laboratorních přístrojů .....	20
4.5	PCR amplifikace DNA nesyta afrického .....	20
4.6	Amplifikované mikrosatelitní lokusy u nesyta afrického .....	21
4.7	Separace PCR produktů provedená za použití gelové elektroforézy .....	24
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>44</b>

## Seznam obrázků

<b>Obrázek č. 1:</b> Řád Ciconiiformes a jeho vztah s vybranými řády vodního ptactva dle Sangster <i>et</i> Mayr (2021).....	3
<b>Obrázek č. 2:</b> Nesyť africký při lovu kořisti, foto M. Jirouš (2009).....	8
<b>Obrázek č. 3:</b> Přehled 38 polymorfních mikrosatelitních lokusů u nesýta afrického, které byly odvozeny z DNA zástupců z řádů trubkonosí a dlouhokřídli.....	35
<b>Obrázek č. 4:</b> Příklad dvoualelového mikrosatelitního lokusu Ptero09 amplifikovaného při teplotě <i>annealingu</i> 63 °C. ....	38
<b>Obrázek č. 5:</b> Mikrosatelitní lokus Parm02 se 3 alelami amplifikovaný při teplotě 61 °C na DNA 6 nepříbuzných jedinců nesýta afrického separovaný po dobu 90 minut.....	38
<b>Obrázek č. 6:</b> Čtyřalelový mikrosatelitní lokus Puff G2C separovaný při teplotě 51 °C po dobu 150 minut.....	38

## Seznam tabulek

<b>Tabulka č. 1:</b> Složení PCR mixu.....	21
<b>Tabulka č. 2:</b> Schéma časového a teplotního průběhu PCR amplifikace.....	21
<b>Tabulka č. 3:</b> Použité mikrosatelity z čeledi albatrosovití.....	22
<b>Tabulka č. 4:</b> Použité mikrosatelity z čeledi buňňáčkovití.....	22
<b>Tabulka č. 5:</b> Použité mikrosatelity z čeledi buňňákovití.....	23
<b>Tabulka č. 6:</b> Použité mikrosatelity od druhů z řádů dlouhokřídlí a pěvci.....	24
<b>Tabulka č. 7:</b> Souhrn 38 polymorfních mikrosatelitních lokusů testovaných u 6 nepříbuzných jedinců nesya afrického ( <i>Mycteria ibis</i> ).....	31
<b>Tabulka č. 8:</b> Souhrn genotypů 38 polymorfních mikrosatelitních lokusů u nesya afrického.....	36
<b>Tabulka č. 9:</b> Mikrosatelity poskytující polymorfismus u nesya afrického, které byly testovány v mé bakalářské práci a srovnání s originálními publikacemi. ....	40
<b>Tabulka č. 10:</b> Souhrn mikrosatelitních lokusů poskytujících polymorfní produkt v mé bakalářské práci u nesya afrického (NA) a srovnání jejich polymorfismu s dalšími 11 druhy kladu Aequorlitorornithes .....	43

# 1 Úvod

Mikrosatelity jsou sekvence složené z krátkých tandemových repetitivních jednotek o délce 1–6 párů bází. Polymorfní lokusy mají největší využití v molekulární biologii, významné jsou především jako genetické markery používané v populačních a konzervačně genetických studiích např. ke studiu genetického driftu a migrace. Pomocí mikrosatelitů je také zkoumána paternita a další příbuzenské vztahy jednotlivých organismů. Mezi vlastnosti polymorfních mikrosatelitů patří především multiallelita, kodominantnost a vyšší mutační rychlost než v jedinečných sekvencích. S největší frekvencí se mikrosatelity vyskytují v genomech eukaryot, výrazně méně v genomech prokaryot a vzácné jsou v genomech virů.

Nesyt africký (*Mycteria ibis*), řadící se mezi málo dotčené druhy, je velký pták z řádu čápi žijící na africkém kontinentu. V rámci experimentální části v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci budu u 6 nepříbuzných jedinců nesyta afrického hledat pomocí PCR amplifikace polymorfní mikrosatelity pocházející od druhů z řádu trubkonosí.



## 2 Cíle práce

- 1) Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
- 2) Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
- 3) PCR amplifikace DNA nesyta afrického s využitím *cross-species* primerů pro mikrosatelity, které jsou známé u ptáků z řádu trubkonosí.



migrují eurasijské druhy do tropických částí Afriky a Asie (del Hoyo *et al.*, 1992). V rámci řádu je největším druhem čáp marabu. Hmotnost samce se pohybuje okolo 9 kg a výška činí přibližně 150 cm od špičky zobáku k drápům nohou. Se svými téměř 2–3 kg a 80 cm je naopak nejmenším zástupcem čáp simbil (del Hoyo *et al.*, 1992). Samci čápů jsou větší než samice a svým kontrastnějším zbarvením peří je lákají k páření (Hudec *et al.*, 2016).

Jejich hlavním znakem je přímý klínovitý zobák uzpůsobený k lovu drobných vodních živočichů, u jednotlivých druhů čápů se liší svou velikostí, barvou i tvarem. Větší šanci ukořistit vyhlédnutou potravu umožňuje jejich protáhlý krk, díky kterému dokážou chytit zobákem kořist při jejím útěku na větší vzdálenost. Dlouhé tenké nohy jsou prodloužené hlavně v bérce a běháku. Prsty na dolních končetinách jsou velmi ohebné, zadní prst čápů, který je vždy mírně zvednutý, slouží k jejich pružné chůzi a stabilnějšímu postoji. Prsty dolní končetiny jsou částečně spojeny blánou (del Hoyo *et al.*, 1992; Gaisler *et Zima*, 2018). Čápi jsou těžcí ptáci, proto nejsou schopni rychle běhat a po několika metrech raději vzlétnou. Křídla zaujímají relativně velkou plochu vzhledem k tělu a jsou perfektně uzpůsobená k plachtění. Rozpětí křídel může u čápa marabu dosahovat i 320 cm (del Hoyo *et al.*, 1992; Hudec *et al.*, 2016). Čápi většinou nelétají v uspořádaných formacích, výjimkou je čáp jihoamerický, který létá v klínových formacích. Některé druhy však dokážou předvádět vzdušnou akrobacii a dokonce létat i hlavou dolů. Ocas čápů je mnohem kratší než jejich dlouhé tenké nohy, které jsou při letu stejně jako krk natažené v jedné rovině. Většina druhů čápů je zbarvena především černě, šedě nebo bíle a na světle má jejich peří duhový efekt. Mláďata jsou převážně zbarvena šedě či hnědě, záleží na konkrétním druhu (del Hoyo *et al.*, 1992). Kostru mají lehkou a pneumatizovanou. K dýchací soustavě kromě plic patří i vzdušné vaky, které slouží jako zásobárna vzduchu. Obvykle mají malý jazyk, třídílný žaludek, samci se vyznačují rudimentárním penisem. Jelikož čápi nemají hlasové svaly, nevyvinulo se u nich hlasové ústrojí. Někteří zástupci syčí, jiní se vyznačují hlasitým hvízdáním. Hlavním komunikačním projevem je však opakované klapání zobáku (Hudec *et al.*, 2016; Gaisler *et Zima*, 2018).

Typickou potravou pro všechny druhy čápů jsou drobní obratlovci (žáby, ryby, hlodavci, hadi a ještěrky) a hmyz. Přijímaná potrava závisí na tvaru a délce zobáku. Čápi při lovení ve vodě stojí na místě nebo pomalu pochodují s pootevřeným zobákem. Při kontaktu zobáku s kořistí dojde k jeho zaklapnutí v řádu milisekund. Chycené kořisti se podaří uniknout jen velmi zřídka. Osazenstvo jednoho hnízda (rodiče a mláďata) zkonsumuje během jedné sezóny asi 200 kg potravy (del Hoyo *et al.*, 1992).

Jedinci různých druhů čápů se rozmnožují od věku 3–5 let a hnízdí převážně na stromech či jiných vyvýšených místech, jako jsou například komíny a sloupy, které jsou typickým hnízdištěm čápa bílého. Některé druhy žijí samotářsky, jiné naopak v hejnech, a to i po tisících jedincích. Hnízda si stavějí hlavně z větví a klacků, u čápa bílého mohou měřit v průměru i 2 m. V koloniích mají čápi hnízda od sebe pouze 30 cm.

Jedinci tvořící spolu pár během jedné sezóny se mohou v následujícím roce shledat a opět se spářit. Páry nebývají trvalejší než několik málo sezón (Barbraud *et al.*, 1999). Samice klade přibližně 2–5 vajec. O vejce i vylíhnutá mláďata se starají oba rodiče do doby, než jsou schopna samostatného života. Mláďata se líhnou asynchronně, po vylíhnutí okamžitě vidí. Pokud se vylíhne slabé a málo vyvinuté mládě, je rodiči většinou vyhozeno z hnízda (del Hoyo *et al.*, 1992; Winkler *et al.*, 2015; Hudec *et al.*, 2016; Gaisler *et Zima*, 2018).

### 3.2 Systematické uspořádání řádu čápi

Monotypický řád čápi ve své jediné čeledi čápoovití (Ciconiidae) obsahuje celkem 19 druhů v 6 rodech, které se dělí do 3 tribů: Mycterini, Ciconiini a Leptoptilini. Tribus Mycterini zahrnuje 6 druhů ve 2 rodech. Prvním rodem je rod *Mycteria*, sem patří 4 druhy - *M. cinerea* (nesyt bílý), *M. ibis* (n. africký), *M. americana* (n. americký) a *M. leucocephala* (n. indický). Druhý rod je *Anastomus* se 2 druhy - *A. lamelligerus* (zejzob africký) a *A. oscitans* (z. asijský). Dále tribus Ciconiini s jedním rodem *Ciconia*, kam patří 7 druhů - *C. abdimii* (čáp simbil), *C. boyciana* (č. východní), *C. ciconia* (č. bílý), *C. episcopus* (č. bělokrký), *C. maguari* (č. jihoamerický), *C. nigra* (č. černý) a *C. stormi* (č. pestrý). Poslední je tribus Leptoptilini skládající se ze 3 rodů, do nichž se řadí celkem 6 druhů. Rod *Ephippiorhynchus* se 2 druhy - *E. asiaticus* (čáp černokrký) a *E. senegalensis* (č. sedlatý). Druhým je monotypický rod *Jabiru*, kde se vyskytuje *J. mycteria* (čáp jabiru). Třetím rodem je *Leptoptilos* se 3 druhy - *L. crumeniferus* (marabu africký), *L. dubius* (m. indický) a *L. javanicus* (m. indomalajský) (Kahl, 1979; Sheldon *et Slikas*, 1997; Gill *et Donsker*, 2022).

### 3.3 Nesyt africký

Nesyta afrického (*Mycteria ibis*) je možno v systému živočichů zařadit takto (dle del Hoyo *et al.*, 2020):

Říše:	Animalia (živočichové)
Kmen:	Chordata (strunatci)
Podkmen:	Vertebrata (obratlovci)
Třída:	Aves (ptáci)
Podtřída:	Neognathae (letci)
Řád:	Ciconiiformes (čápi)
Čeleď:	Ciconiidae (čápovití)
Tribus:	Mycterini
Rod:	<i>Mycteria</i> (nesyt)
Druh:	<i>Mycteria ibis</i> (nesyt africký)

Nesyt africký patří mezi čápy, jejichž domovinou je především jih Afriky a západní část Madagaskaru. Zástupci tohoto druhu nejčastěji preferují život v blízkosti břehů řek, jezer, mokřadů a zaplavených oblastí. Nesyt africký sídlí často nedaleko měst, méně v lesích či savanách (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993; Winkler *et al.*, 2015). Hnízdí po 10 až 20 jedincích nejčastěji na stromech jako jsou např. baobaby či akácie. V celém areálu je tento druh početně stabilní, populace nejsou nijak výrazně početně kolísavé (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993).

Nesyty obvykle váží 1,2–2,3 kg, jejich tělo je dlouhé přibližně 1 m. Samice bývají o něco menší. Peří na hlavě a krku má lehce našedlou barvu, oči jsou šedohnědé, tváře a dlouhé nohy jsou sytě červené barvy (Winkler *et al.*, 2015). Nesyt africký se pohybuje velmi pomalým a rozvážným krokem. Zobák je dlouhý, mírně zakřivený a zbarvený do sytě žluté barvy. Hřbet, hrud', břicho, spodní a horní strana křídel jsou naopak čistě bílé (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993). Při námluvách se červená barva nažin a bílá barva peří výrazně zjasňují, opeření má poté lehký nádech do růžova. V tomto období námluv holá místa pokožky záměrně odhaluje. Ocas a peří na křídlech jsou černé. Let nesytů se skládá ze dvou částí. První část je aktivní, kdy se jedinci dostanou pomocí

silných úderů křídel do výšky, v druhé části se jedná o plachtění zpět směrem dolů (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993).

Nesyti afričtí vydávají zvuky většinou pouze při námluvách a v období páření a péče o mláďata. Jedná se o zvláštní zvuky, které připomínají zvuk vrzavých dveří. Mláďata vydávají specifický zvuk, kterým vyžadují pozornost rodičů (Brown *et al.*, 1993). Klapání zobákem je pozorováno hlavně u pářících se jedinců (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993).

Námluvy jsou provázené typickým chováním, kdy samec láká samici. Jakmile spolu vytvoří pár, podílejí se oba 7–10 dní na stavbě hnízda, které se skládá především z klacíků a je vystlané listím a rákosím. Nové hnízdo si pár staví většinou každý rok, avšak je možné si také pouze upravit dosavadní hnízdo (Brown *et al.*, 1993; Winkler *et al.*, 2015). Hnízdo má průměr 1 m s hloubkou 0,2–0,3 m (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993).

Samice obvykle kladou 2–4 vejce. Skořápka vajec je matně bílá. Každá populace, která žije na jiném území Afriky či Madagaskaru, snáší vejce v odlišných měsících, nejčastěji však v období dlouhých dešťů (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993; Hudec *et al.*, 2016). Mláďata se líhnou v intervalu 2 dnů a jsou zpravidla šedoohnědá s matně šedožlutým zobákem. Tváře mají jemně oranžové. Tenké nohy, peří na křídlech i ocas jsou zbarveny do tmavě hnědé barvy. Po zhruba 10 dnech života se jejich peří zbarvuje do jasně bílé. V mládí lze díky totožnému zbarvení zaměnit nesytu afrického za čápa bílého (del Hoyo *et al.*, 1992). V dospívání se liší již výraznými znaky. Pozornost rodičů vůči mláďatům je snížena zhruba po 21 dnech. Mláďata následně opouštějí hnízdo samostatně, bez pomoci rodičů. Dospělost přichází 3. rokem, kdy by měli být jedinci již schopni rozmnožování (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993).

Živí se především drobnými obratlovci, kteří žijí v mělkých vodách. Při lovení potravy ponoří téměř celý zobák do vody a zároveň jednou nohou víří bahno okolo. Často také využívají svá křídla na zastínění daného místa, kde chtějí kořist ulovit. Pokud zaznamenají, že se kořist pohnula, okamžitě ji sevřou svým mohutným zobákem. Potravu polykají obvykle živou. Mezi jejich potravu se řadí i suchozemští obratlovci a hmyz, které vybírají ze suchého písku (Brown *et al.*, 1993). Příjem potravy je krátký a intenzivní, přerušovaný dlouhou dobou odpočinku. Mláďata jsou krmena tak, že rodiče spolknutou potravu vyvrhnou na dno hnízda a mláďata ji pozřou. Pokud jsou velmi hladová, potravu polykají již při samotném vyvrhování rodičem (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993).

Nesyti afričtí se řadí mezi stěhovavé čápy. Na jih Afriky přilétají hlavně v říjnu a odlétají v dubnu. Trvale se vyskytují v Zimbabwe, Zambii a dalších tropických oblastech východní Afriky. Migrace tohoto druhu čápa není stále dokonale zdokumentována (Brown *et al.*, 1993).



Obrázek č. 2: Nesyt africký při lovu kořisti, foto M. Jirouš (2009).

### 3.4 Mikrosatelity

Mikrosatelity známé od začátku 80. let 20. století, jsou jednoduché tandemově se opakující 1–6nukleotidové repetice (STRs) (Goldstein *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2006; Avvaru *et al.*, 2020). Společně v genetických studiích, populační genetice, konzervační genetice, při forenzních analýzách a testování otcovství jsou díky své variabilitě a polymorfismu jedněmi z nejpoužívanějších molekulárních markerů pro genetické mapování s vysokým rozlišením (Oliveira *et al.*, 2006; Barbará *et al.*, 2007). Mikrosatelity se v ptačím genomu vyskytují rovnoměrně, jsou zastoupeny v 0,13–0,49 % (Huang *et al.*, 2016). V lidském genomu zabírají mikrosatelity cca 3 %. Vzhledem k vysoké mutabilitě mikrosatelitů se předpokládá i jejich role v evoluci genomu. Mikrosatelity mohou mít významnou funkci také v genové expresi (Tautz *et al.*, 1986; Kashi *et al.*, 1997; Avvaru *et al.*, 2020).

V 80. a 90. letech byly mikrosatelity studovány v souvislosti s výzkumem člověka, na přelomu tisíciletí se mikrosatelitní analýza stala jedním z nejdůležitějších nástrojů pro

výzkum rostlin a zvířat. Mikrosatelity jsou selekčně neutrálními markery, pokud se vyskytují v nekódujících oblastech. V exonech či v regulačních oblastech změna počtu opakujících se jednotek může způsobit různá onemocnění člověka (Strand *et al.*, 1993). Mikrosatelity se vyskytují u všech organismů, výrazně častěji u eukaryot (Rajendrakumar *et al.*, 2007). Dokonce byly popsány i v genomech virů (Field *et Wills*, 1998; Tóth *et al.*, 2000; Ouyang *et al.* 2012). Mikrosatelity se nacházejí v blízkosti rozptýlených opakujících se elementů, jako jsou krátké (SINEs) a dlouhé (LINEs) rozptýlené repetice (Ellegren, 2004).

Polymorfní mikrosatelitní lokusy jsou kodominantní, multialelické a nestabilní, jsou velmi dobře schopny odlišit blízkce příbuzné jedince a jejich studium je založeno na PCR amplifikaci, která má vysokou reprodukovatelnost (Goldstein *et Pollock*, 1997). Ideální mikrosatelit pro studium variability by měl mít i více než 10 alel. V populaci by měl vykazovat též vysokou heterozygotnost (Ellegren, 2004), která by se měla ideálně pohybovat nad 60 %. U některých mikrosatelitů se heterozygotnost blíží až k 90 % (Goldstein *et Pollock*, 1997). Alely heterozygotního lokusu se liší svojí délkou, respektive počtem opakování repetitivní jednotky. Jedinec homozygotní v rámci daného mikrosatelitního lokusu má obě alely stejně dlouhé.

Mikrosatelitní markery jsou vhodné pro určení genetické individuality a analýzy jedinců v blízkém příbuzenském vztahu. Na jednu generaci vykazují vyšší rychlost mutací v rozmezí  $10^{-2}$  až  $10^{-6}$  nukleotidů na lokus, než jiné části genomů (Sia *et al.*, 2000). Vysoká mutační rychlost mikrosatelitů je způsobená např. chybami během rekombinace chromatid či nerovnoměrným crossing-overem (Strand *et al.*, 1993). Předpokládá se, že polymorfismus mikrosatelitů vzniká tzv. „sklouznutím DNA polymerázy“ či „sklouznutím DNA“ během replikace DNA a jsou tak náchylné k dvouřetězovým zlomům. DNA polymeráza špatně převede templátový úsek mikrosatelitu do nového vlákna, přidá nebo ubere 1 či více jednotek repetice a vznikají 2 dvouvlákna s odlišným počtem repetic (Bennett, 2000). Výsledkem může být nová délková alternativa, tedy nová alela, která je děděna v potomstvu (Ananda *et al.*, 2014; Gadgil *et al.*, 2020). Rychlost a směr skluzu jsou ovlivněny i počtem, umístěním a sekvencí repetic. Tyto mutace jsou závislé na délce a motivu repetiční sekvence (Ellegren, 2004).

Existuje několik typů dělení mikrosatelitů. Jedním z možností je dle toho, jakým způsobem jsou vzájemně jednotlivé repetiční jednotky uspořádány. Mikrosatelity se tak dělí na dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené. Dokonalé mikrosatelity mají



sekvenci, která není narušena jiným nukleotidem (CAGCAGCAGCAGCAG). Druhým typem je nedokonalý mikrosatelit (CAGCAGTCAGCAG), kde je dokonalost mikrosatelitového motivu narušena výskytem jiné báze (Kofler *et al.*, 2008). Jako třetí typ je označován mikrosatelit přerušovaný (CAGCAGCATCAGCAG, u něhož se mezi 2 opakujícími se repetitivními sekvencemi nachází odlišná, obvykle kratší sekvence s jiným motivem. Posledním typem je složený mikrosatelit (CAGCAGCAGCATCATCAT), ve kterém je za jednou dokonalou sekvencí přítomna sekvence s jinou jednotkou repetic (Oliveira *et al.*, 2006). Nejčastějšími polymorfními mikrosatelity jsou mikrosatelity složené (Chen *et al.*, 2011).

Další možností dělení mikrosatelitů je dle počtu nukleotidů v repetitivní jednotce, na základě tohoto kritéria rozlišujeme mikrosatelity s jednotkou opakování o délce 1–6 nukleotidů (Tóth *et al.*, 2000). V oblastech intronů se nacházejí nejvíce repetic mono-, di- a tetranukleotidové. V exonech převažují hlavně tri- a hexanukleotidové repetic. Nejhojnější výskyt mononukleotidových repetit je v genomech primátů, hlodavci mají repetic složené nejčastěji z dinukleotidů AT, u hub se tyto dinukleotidové sekvence vyskytují zdaleka v menší míře. Vzácnější formou repetit u zmíněných organismů jsou repetic GC. Trinukleotidové repetic lze nalézt v každé genomové oblasti s významnou frekvencí, kdy u všech obratlovců dominuje v exonech opakování GCC. Repetic AAT se opakují v exonech kvasinek a jiných hub. Tyto trinukleotidové repetic jsou kvůli nestabilitě DNA v nekanonických strukturách u člověka zodpovědné za spoustu neurodegenerativních poruch jako je např. Huntingtonova choroba, syndrom fragilního X chromozomu, spinocerebrální ataxie, myotonická dystrofie, spinální-bulbární svalová atrofie, avšak i některé typy lidských rakovin, např. dědičný nepolypózní kolorektální karcinom (Wooster *et al.*, 1994; Arzimanoglou *et al.*, 1998; Verma *et al.*, 2019; Gadgil *et al.*, 2020). Změny v sekvencích mikrosatelitů mohou být způsobené například patogenními viry a vedou k tzv. fenotypové změně, pokud se nacházejí v kódujících oblastech (Deback *et al.*, 2009; Strivastava *et al.*, 2019).

Mezi repetic, které se v exonech vyskytují v nejmenším množství, patří repetic pentanukleotidové. Jejich zastoupení v DNA je zhruba totožné s frekvencí trinukleotidových repetit v intronech a intergenních místech (Tóth *et al.*, 2000). Počet mikrosatelitních lokusů vzhledem k větším genomům savců roste, zatímco u rostlin při zvětšování jejich genomu počet mikrosatelitů klesá (Ellegren, 2004).

Proces hledání polymorfních mikrosatelitů pro konkrétní druh vyžaduje značné

finanční a materiální náklady a jejich izolaci se věnují vědečtí pracovníci i několik týdnů až měsíců (Primmer *et al.*, 1996). Často se stává, že mikrosatelity odvozené pro 1 druh jsou použitelné pro druh jiný, proto se metoda označuje jako *cross-species* PCR amplifikace neboli „mezidruhová“ mikrosatelitní amplifikace. Záleží na fylogenetickém či evolučním původu dané sekvence a jak byla tato sekvence u jednotlivých druhů v jejich evoluční cestě mutacemi měněna, jakým způsobem a jak často. Na základě toho je možné najít páry primerů, pomocí kterých se dá totožný lokus amplifikovat u různých druhů téhož rodu, s klesající pravděpodobností v rámci stejné čeledi, řádu, ale i třídy (Moore *et al.*, 1991, Schloterter *et al.*, 1991, Oliveira *et al.*, 2006). Příkladem úspěšné amplifikace polymorfních lokusů v rámci jednoho rodu je např. studie Sun *et al.* (2009), která odvodila páry primerů od buňňáčka madeirského a testovala pomocí nich polymorfismus u buňňáčka dlouhokřídlého a Monteirova. Bried *et al.* (2008) v rámci jedné čeledě u různých rodů našli polymorfismus mikrosatelitů u buňňáka Bulwerova s použitím primerů pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitních lokusů od buňňáka šedého. Menší úspěšnost je u různých čeledí v rámci jednoho řádu, např. studie Techow *et al.* (2004), kdy primery amplifikující mikrosatelity u buňňáka bělobradého úspěšně použili k amplifikaci těchto polymorfních lokusů u albatrose stěhovavého. Amplifikace je možná i mezi řády jedné třídy, kdy např. Brown *et al.* (2009) otestovali polymorfni mikrosatelity od buňňáka trinidadského na tučňáku žltorohém. U živočichů literatura uvádí větší efektivitu získání mezidruhových polymorfních mikrosatelitů než u rostlin (Barbarà *et al.* 2007).

Úspěšná amplifikace mikrosatelitů mezi druhy závisí na podobnosti, ideálně stejnosti sekvence, kdy primery odvozené od donorového druhu jsou testované na recipientním druhu. S rostoucí evoluční vzdáleností možnost amplifikace stejných polymorfních lokusů mezi organismy klesá (Galbusera *et al.*, 2000). U ryb a savců jsou mikrosatelity v genomech frekventovanější než v genomech ptáků (Primmer *et al.*, 1997; Neff *et al.* 2001). Mikrosatelity jsou ve srovnání s dalšími molekulárními markery vysoce polymorfni (Oliveira *et al.*, 2006).

Doposud byly u různých organismů objeveny asi 4 miliardy mikrosatelitních lokusů. Byla vytvořena MSDB databáze (Microsatellite DataBase) mikrosatelitů vyskytujících se ve více než 37 500 genomech dostupných v různých genomových úložištích. Tato databáze napomáhá snadnému a rychlému vyhledávání mikrosatelitů, v rámci ní je možno porovnávat sekvence a je neustále pravidelně aktualizována (Avvaru *et al.*, 2020).

### 3.5 Polymorfní mikrosatelity od druhů z řádu trubkonosí

Řád trubkonosí je dělen do 4 čeledí - albatrosovití (Diomedidae), buňňáčkovití (Hydrobatidae), burňákovití (Procellariidae) a buňňíkovití (Pelecanoididae). Různí autoři uvádějí, že trubkonosí zahrnují přibližně 120–130 druhů (Gaisler *et* Zima, 2018, del Hoyo *et al.*, 2020). V rámci Laboratoře populační genetiky máme 207 párů primerů pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitů od druhů tohoto řádu. Podrobně vzhledem k čeledím a jednotlivým druhům je uvádím v Tabulkách č. 3–6. V Laboratoři je také 6 párů mikrosatelitních primerů, které amplifikovaly polymorfní produkt u některého druhu trubkonosí, ale odvozeny od nich nebyly. Jedná se o 5 párů primerů z řádu dlouhokřídli (Charadriiformes), a to od racka novozélandského, kulíka mořského a alkouna holubího (*Cephus columba*). Poslední pár pochází od lesňáčka žlutohého z řádu pěvci (Passeriformes).

#### 3.5.1 Polymorfní mikrosatelity od druhů z čeledi albatrosovití

Celkem od 7 druhů jsou v Laboratoři populační genetiky mikrosatelitní primery (53 párů), viz Tabulka č. 3 - od albatrose stěhovavého, jižního, šedohlavého, černobrvého, bělohřbetého, černonohého a laysanského.

Burg (1999) odvodila páry primerů pro amplifikaci celkem 26 mikrosatelitů podle DNA sekvencí albatrose stěhovavého a šedohlavého, kteří žijí na pobřeží a ostrovech všech oceánů na zeměkouli. Z DNA sestavila 2 genomické knihovny, jednu s fragmenty obsahujícími (AC)<sub>n</sub> a druhou s fragmenty obsahujícími (CTTT)<sub>n</sub> repetice. Burg navrhla 31 párů primerů, které byly použity ke *cross-species* PCR amplifikaci. Polymorfismus se vyskytl u 21 mikrosatelitů (2–10 alel) a 3 lokusy poskytly monomorfní produkt. Poslední 2 mikrosatelitní lokusy byly u albatrose stěhovavého bez produktu, naopak u albatrose šedohlavého a černobrvého ve všech případech našla polymorfismus, ale počet alel nepublikovala.

Burg *et* Croxall (2001) studovali albatrosy černobrvé, šedohlavé a Campbellovy. V rámci mikrosatelitní analýzy vybrali 6 mikrosatelitů z předchozí zmíněné publikace Burg (1999) a další nový, doposud nepoužitý De35. U 765 jedinců albatrosa černobrvého jednotlivé mikrosatelity vykazovaly 4–13 alel a u 756 jedinců albatrosa šedohlavého se vyskytovalo 5–22 alel.

Burg *et* Croxall (2004) použili 9 polymorfních mikrosatelitních lokusů a mikrosatelit

De37, které testovali u albatrosa stěhovavého, jižního a Gibsonova. Mikrosatelit De33 měl 4–6 alel, ale kvůli své vazbě na pohlavní chromozom W byl z dalších analýz vyřazen.

Dubois *et al.* (2005) popsali 10 polymorfních mikrosatelitních lokusů pro albatrosy stěhovavé, pocházející z Crozetových a Kerguelenových ostrovů. Genomická DNA byla izolována z krve pomocí QIAmp Tissue Kit (QIAGEN). Dohromady PCR produkty mikrosatelitů všech jedinců obsahovaly 2–13 alel. Tyto lokusy byly amplifikovány také u buňáka sněžného a Bulwerova, kdy jich 8 vykazovalo polymorfní produkt. U zbývajících 2 lokusů nedošlo k amplifikaci žádných alel. Autoři počty alel neuvádějí.

Hernandez *et al.* (2014) testovali 16 párů primerů na 36 albatrosech bělohřbetých, třech černonohých a dvou laysanských. Z DNA izolované z tkání těchto jedinců byly vytvořeny genomické knihovny. Celkem 13 lokusů vykazovalo u albatrosa černonohého a laysanského polymorfismus s výskytem 2–18 alel. Jedinci a. bělohřbetého měli polymorfních 14 lokusů, kdy se počet alel pohyboval mezi 2–7 alelami.

### **3.5.2 Polymorfní mikrosatelity od druhů z čeledi buňáčkovití**

Počet párů primerů, které pocházejí z řádu trubkonosí od čeledi buňáčkovití - buňáček dlouhokřídlý, madeirský a Monteirov (viz Tabulka č. 4), byl celkem 54.

Sun *et al.* (2009) odvodili z DNA 9 párů primerů pro mikrosatelity od buňáčka madeirského odchyceného na Madeiře a 1 pár primerů od skandinávského druhu buňáčka dlouhokřídlého. K hybridizaci s genomickou DNA se použila směs 3 biotinylovaných oligonukleotidových sond - (AC)<sub>13</sub>, (AG)<sub>13</sub> a (GAA)<sub>8</sub>. Pro každý druh byla následně sestavena knihovna. Z 96 osekvenovaných klonů bylo vybráno 20, z nich odvozené páry primerů byly testovány u 73 jedinců 3 druhů, a to u 27 buňáčků madeirských, 24 buňáčků dlouhokřídlých a 22 buňáčků Monteirových pocházejících z Azorských ostrovů. 9 mikrosatelitů vykazovalo polymorfní produkt u buňáčka madeirského a Monteirova, kdy byl počet alel 2–11. Další 8 polymorfních lokusů bylo amplifikováno u buňáčka dlouhokřídlého s počtem 2–9 alel.

Bicknell *et al.* (2011) amplifikovali 50 párů primerů u 4–6 jedinců buňáčka dlouhokřídlého z ostrova Gull (Newfoundland, Kanada). Genomická knihovna byla sestavena z fragmentů DNA obsahujících repetice (GT)<sub>n</sub>, (CT)<sub>n</sub>, (GTAA)<sub>n</sub>, (CTAA)<sub>n</sub>, (TTTC)<sub>n</sub> a (GATA)<sub>n</sub>. 26 mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních, 18 lokusů vykazovalo monomorfní produkt a 6 z nich jich bylo bez produktu. Bicknell *et al.* (2011)

počty alel neuvádějí. Veškeré mikrosatelity poskytující polymorfismus byly podrobeny další amplifikaci na 24 jedincích (14 samců a 10 samic), kdy se počet alel rovnal 2–22. 4 lokusy byly určeny jako vázané na chromozom Z.

Bried *et al.* (2012) se zabývali studiem buňňáčků Monteirových z ostrova Praia na Azorském sousostroví, u nichž objevili 18 mikrosatelitů. Z DNA izolované z krve pomocí QIAamp Tissue Kit (QIAGEN) byla následně vytvořena genomická knihovna obohacená o (TG)<sub>10</sub> a (TC)<sub>10</sub> repetice. Bylo vybráno 27 lokusů, z nichž pouze 18 bylo použito ke zkoumání genetické variability 65 samic a 60 samců buňňáčka Monteirova. Na lokusech bylo detekováno 4–17 alel. Pouze jeden z nich byl vázán na chromozom Z.

### 3.5.3 Polymorfní mikrosatelity od druhů z čeledi buňňákovití

Další páry primerů (100), kterými Laboratoř populační genetiky disponuje, byly nalezeny u buňňáka šedého, Bulwerova, bělobradého, trinidadského, taiko, havajského, baleárského, světlonohého a útlozobého.

Techow *et O’Ryan* (2004) testovali 10 párů primerů u 68 jedinců buňňáka bělobradého, jehož typickými regiony výskytu jsou ostrovy v Indickém oceánu. Po izolaci DNA byla sestavena knihovna s fragmenty s opakujícími se dinukleotidy (CA)<sub>n</sub>. Výsledkem amplifikace bylo 6 polymorfních mikrosatelitních lokusů se 3–9 alelami a další 4 lokusy poskytly monomorfní produkt. Mikrosatelity byly poté podrobeny dalšímu testování u buňňáka Hallova, obrovského, tristanského i albatrose černobrvého, stěhovavého a šedohlavého. U daného druhu se vyskytoval polymorfismus vždy aspoň u 3 mikrosatelitů. Počet alel autoři neuvádějí.

Bried *et al.* (2008) zkoumali polymorfismus u 43 jedinců buňňáka šedého, jejichž přirozenou lokalitou je Azorské souostroví. Na počátku byla sestavena genomická knihovna s větším zastoupením dinukleotidových opakování. Z vybraných 15 mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních jen 11, kdy byl počet alel v rozmezí 2–8 na lokus. Jeden z lokusů se nacházel na chromozomu Z. Dále byla použita i amplifikace u albatrose stěhovavého, buňňáka bělobradého a b. Bulwerova, kdy u a. stěhovavého vykazoval polymorfní produkt pouze 1 lokus, u b. bělobradého byly polymorfní 2 mikrosatelity a u b. Bulwerova se objevilo největší množství polymorfních lokusů, a to 10. Zbylé mikrosatelity byly buď monomorfní nebo neposkytly žádný produkt.

Lawrence (2008) objevila u buňňáka Taiko z Nového Zélandu a okolních ostrovů

2 mikrosatelity poskytující polymorfni produkt. Z jejich krve byla získána DNA a z ní poté sestavena knihovna s (GT)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (AAT)<sub>n</sub>, (AAAG)<sub>n</sub> repeticemi. Po použití 9 navržených párů primerů proběhla amplifikace pouze u 4 mikrosatelitů. 2 lokusy byly z dalšího testování vyřazeny kvůli nedostatečnému polymorfismu či selhání PCR amplifikace. V další analýze bylo opět testováno 9 nových párů primerů, kdy polymorfni byl pouze 1 lokus se 4 alelami.

Brown *et al.* (2009) studovali buňáka trinidadského obývajícího ostrov Round, který je součástí souostroví Seychely. Charakterizovali 6 polymorfni mikrosatelitních lokusů, kdy vzorky odebrané ze 3 mrtvých mláďat sloužily k izolaci genomické DNA, která poté byla využita k vytvoření knihovny s di- a tetranukleotidovými repeticemi. Amplifikovalo se 6 mikrosatelitních lokusů (ze 43), z kterých byl určen polymorfismus u 3 lokusů (4–10 alel). Dále byly amplifikované lokusy znovu otestovány i u dalších druhů z řádu trubkonosí a také u tučňáka žlutorohého. Počet alel byl 2–9. Poslední analýzou byla PCR amplifikace za využití mikrosatelitních lokusů (53) již známých u kulíka mořského, buňáka bělobradého, albatrose stěhovavého a šedohlavého, které testovali na již zmíněném buňáku trinidadském. Polymorfni produkt poskytlo pouze 6 mikrosatelitů, počty alel autoři neuvádějí.

Gonzalez *et al.* (2009) se snažili najít polymorfismus u 23 mikrosatelitů odvozených od buňáka baleárského hnízdícího na ostrovech Ibiza a Cabrera. Návrhu primerů předcházelo sestavení dvou genomických knihoven, na jejichž tvorbu byla použita DNA b. baleárského izolovaná ze svalů fenol-chloroformovou metodou s předpůsobením proteinázy K. Polymorfni mikrosatelitů bylo celkem 10 s 2–10 alelami, zbylé lokusy byly monomorfni. Tyto mikrosatelity poskytující polymorfni produkt u b. baleárského byly podrobeny další PCR amplifikaci u buňáka středomořského, u kterého byl detekován polymorfismus v 9 lokusech (počty alel nejsou v článku uvedeny).

Andris *et al.* (2010) se zabývali studiem polymorfni lokusů u azorského buňáka Bulwerova, který byl odchycen na ostrově Vila Franca. Za použití kuliček pokrytých streptavidinem a kompetentních bakterií *E. coli* získali knihovnu z genomické DNA s vyšším zastoupením repetice (TG)<sub>10</sub> a (TC)<sub>10</sub>. 25 mikrosatelitů vybrali pro následující PCR amplifikaci na 91 jedincích. K výskytu polymorfismu (se 2–8 alelami) došlo u 24 mikrosatelitních lokusů, avšak kvůli potížím během amplifikace 13 z nich nebylo do dalších analýz zařazeno. Polymorfismus těchto lokusů dále testovali u buňáka bělobradého a modravého a buňáčka Monteirova, kdy z celkového počtu byly polymorfni

pouze 2 lokusy. Autoři počet alel neuvádějí.

Welch *et al.* (2011) získali 10 polymorfních mikrosatelitů pro buňáka havajského. Po sestavení knihovny obohacené o fragmenty (CA)<sub>10</sub>, (AAAG)<sub>5</sub>, (AAAC)<sub>5</sub> a (AGAGG)<sub>5</sub> byla provedena amplifikace 65 mikrosatelitních lokusů na 15 jedincích. Výsledkem amplifikace bylo 10 lokusů s polymorfním produktem, jejichž počet alel se pohyboval v rozmezí 3–10. Welch *et al.* (2011) provedli analýzu dalších mikrosatelitů pomocí 37 párů primerů z řádů trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci a na základě toho pro jejich amplifikaci navrhli nové páry primerů, aby získali kratší, lépe hodnotitelné produkty.

Quillfeldt *et al.* (2012) se při svém výzkumu zaměřili na buňáka útlozobého obývajícího Falklandské ostrovy (Malvíny). Zdrojem izolace DNA bylo peří 25 dospělých buňáků a také krev 77 jedinců tohoto druhu (43 dospělých a 34 mláďat). Po provedení *cross-species* PCR amplifikace bylo detekováno celkem 7 polymorfních lokusů. Vzhledem k tomu, že chtěli mikrosatelity využít pro studium otcovství, vyřadili některé lokusy z dalšího testování kvůli jejich problematickému rozlišení či jejich vazbě na pohlavní chromozom Z. Počet alel nebyl v publikaci uveden.

Hardesty *et al.* (2013) popsali u buňáka světlonohého, vyskytujícího se po celé délce pobřeží Indického a Tichého oceánu, 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Ze vzorků krve a peří 46 jedinců byla vyizolována DNA a následně rozštěpena restričními enzymy. Autoři poté sestrojili knihovnu s výskytem (AAC)<sub>12</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CATC)<sub>8</sub> a (TAGA)<sub>8</sub> repetit. Z testovaných 25 mikrosatelitů bylo 11 z nich polymorfních se 3–13 alelami.

Moodley *et al.* (2015) navrhli 36 párů primerů pro studium polymorfních mikrosatelitů u buňáků útlozobých a holubích. Po tom, co byla sestrojena genomická knihovna s fragmenty obsahujícími dinukleotidová opakování. Po jejich osekvenování a návrhu párů primerů byly vybrané lokusy podrobeny amplifikaci. Celkem poskytlo polymorfismus 26 mikrosatelitů, z toho bylo nutné 1 lokus vyřadit. Zbývajících 25 lokusů prošlo u b. útlozobých další amplifikací, jejímž výsledkem byly polymorfní produkty u všech 36 mikrosatelitů s 5–48 alelami.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál pro analýzu mikrosatelitů byl do Laboratoře populační genetiky dodán od jedinců chovaných v Zoologické zahradě Zlín-Lešná. Z odebrané krve, která pocházela ze 6 nepříbuzných jedinců nesýta afrického (*Mycteria ibis*), byla následně vyizolována DNA za použití fenol-chloroformové metody, což provedl vedoucí mé bakalářské práce. Po jejím rozpuštění v TE pufru byla zjištěna její koncentrace a DNA byla pro PCR naředěna mezi 10 až 20 µg/ml.

### 4.2 Seznam použitých chemikálií

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5 U·µl<sup>-1</sup>), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTPs) (100 mmol·l<sup>-1</sup>, 400 µl každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol (96% roztok) (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid draselný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- Laurylsíran sodný (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N,N'-metylenbisakrylamid (Serva)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)



- Tekuté stěrače Rain Off (Sheron)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (AppliChem)
- Triton X-100 (Amresco)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

### **4.3 Seznam použitých roztoků a jejich příprava**

#### **Reakční pufr pro PCR (10x)**

- 1,211 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu
- 3,73 g chloridu draselného
- 1 ml Triton X-100
- 80 ml deionizované vody
- Pomocí HCl upravit na pH 9 a poté doplnit do 100 ml deionizovanou vodou.

#### **Fix/stop roztok**

- 88 ml ledové kyseliny octové
- 800 ml deionizované vody

#### **Nanášecí pufr**

- 25 ml deionizované vody
- 100 ml formamidu
- 0,125 g xylenové modře
- 0,125 g bromfenolové modře
- Výsledný pufr uchovat v chladničce.

#### **Roztok kyseliny dusičné**

- 12 ml 65% kyseliny dusičné
- 800 ml deionizované vody

#### **Roztok dusičnanu stříbrného (0,1%)**

- 0,8 g dusičnanu stříbrného
- 800 ml deionizované vody
- Před použitím k vychlazenému roztoku přidat 1,2 ml formaldehydu.

### **Roztok hydroxidu sodného (1 mol·l<sup>-1</sup>)**

- 40 g hydroxidu sodného rozpustit v 1 l deionizované vody

### **Roztok peroxidisíranu amonného (10%)**

- 1 g peroxidisíranu amonného
- 10 ml deionizované vody
- Rozpustit a uchovat v chladničce.

### **Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu**

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

### **Roztok polyakrylamidového gelu (6%)**

- 40 μl N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminu
- 400 μl 10% roztoku peroxidisíranu amonného
- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

### **Zásobní roztok akrylamidu (6%)**

- 420 g močoviny rozpustit v 484 ml deionizované vody
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu : N,N'-methylenbisakrylamidu v poměru 19:1
- Roztok uchovat v tmavé láhvi v chladničce.

### **Zásobní roztok TBE pufru (10x)**

- 55 g kyseliny borité
- 108 g tris(hydroxymethyl)aminometanu
- 40 ml 0,5 mol·l<sup>-1</sup> roztoku ethylendiaminotetraoctanu sodného (pH 8,0)
- Doplnit do 1 l deionizovanou vodou.

### **Vývojka**

- 24 g uhličitanu sodného
- 800 ml deionizované vody
- Rozpustit a uložit do chladničky, před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μl thiosíranu sodného

#### 4.4 Seznam laboratorních přístrojů

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipeta Finnpiette 0,5–10  $\mu$ l - osmikanálová (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Finnpiette 0,3–1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5–1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA 1 (Maneko)
- Sekvenční elektroforetická komora S2 (Whatman Biometra)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler XP Thermal Cycler (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Ice Flanker (Brema Ice Makers)

#### 4.5 PCR amplifikace DNA nesyta afrického

Genomická DNA z 6 nepříbuzných jedinců nesyta afrického (*Mycteria ibis*) byla amplifikována pomocí PCR:

- 1) PCR mix připravit podle Tabulky č. 1 v 1,5ml zkumavce, po zvortexování a centrifugaci rozpipetovat po 9  $\mu$ l do 0,2ml mikrozkuvek. Každá z mikrozkuvek dále obsahuje po 1  $\mu$ l roztoku DNA. Po napipetování mixu i DNA mikrozkuvky zvortexovat a zcentrifugovat.

**Tabulka č. 1:** Složení PCR mixu.

Složka PCR mixu	Koncentrace zásobního roztoku	Objem [ $\mu$ l]
Deionizovaná voda	–	44,4
Reakční pufr	10x	6,7
Roztok roztok $MgCl_2$	25 mmol/l	4,0
Roztok dNTPs	20 mmol/l	0,7
Primer F	10 mmol/l	3,3
Primer R	10 mmol/l	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	5 U/ $\mu$ l	1,0

- 2) Jednotlivé mikrokumavky s nachystanými vzorky umístit do termocyklieru a nastavit časové a teplotní parametry podle Tabulky č. 2.

**Tabulka č. 2:** Schéma časového a teplotního průběhu PCR amplifikace.

Teplota [ $^{\circ}C$ ]	Čas	Počet cyklů
94	5 min	1
94	30 s	35
50	30 s	
72	30 s	
72	7 min	1

#### 4.6 Amplifikované mikrosatelitní lokusy u nesýta afrického

Celkem jsem v rámci svých experimentů otestovala 213 párů primerů, jejichž seznam pro přehlednost rozdělený na jednotlivé čeledi, respektive řády, ze kterých tyto markery pocházely, uvádím v Tabulkách č. 3–6.

**Tabulka č. 3:** Použité mikrosatelity z čeledi albatrosovití.

Mikrosatelitní lokus	Donorový druh	Citace
De1, De2, De3, De7, De11, De12, De17, De18, De25, De30, De33		Burg, 1999
De35	Albatros stěhovavý	Burg <i>et</i> Croxall, 2001
De37	( <i>Diomedea exulans</i> )	Burg <i>et</i> Croxall, 2004
6A3, 6F12, 7D8, 10C5, 11F3, 11H1, 11H7, 12C8, 12H8, 12E1		Dubois <i>et al.</i> , 2005
D6, D24, D29, D32	Albatros stěhovavý ( <i>D. exulans</i> ), Albatros šedohlavý ( <i>D. chrysostoma</i> )	Burg, 1999
Dc5, Dc9, Dc10, Dc16, Dc19, Dc20, Dc21, Dc22, Dc26, Dc27, Dc31	Albatros šedohlavý ( <i>D. chrysostoma</i> )	
STAL4, STAL8, STAL12, STAL18, STAL20, STAL24	Albatros bělohřbetý ( <i>Phoebastria albatrus</i> )	
BFAL4, BFAL11, BFAL14, BFAL19, BFAL20	Albatros černonohý ( <i>P. nigripes</i> )	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
LAAL1, LAAL7, LAAL10, LAAL19	Albatros laysanský ( <i>P. immutabilis</i> )	

**Tabulka č. 4:** Použité mikrosatelity z čeledi buřňáčkovití.

Mikrosatelitní lokus	Donorový druh	Citace
Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B	Buřňáček madeirský ( <i>Oceanodroma castro</i> )	Sun <i>et al.</i> , 2009
O110-39		
Ole01, Ole02, Ole03, Ole4, Ole05, Ole06, Ole07, Ole08, Ole09, Ole10, Ole11, Ole12, Ole13, Ole14, Ole15, Ole16, Ole17, Ole18, Ole19, Ole20, Ole21, Ole22, Ole23, Ole24, Ole25, Ole26	Buřňáček dlouhokřídlý ( <i>O. leucorhoa</i> )	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
Omn1, Omn2, Omn3, Omn4, Omn6, Omn7, Omn8, Omn11, Omn14, Omn15, Omn16, Omn17, Omn21, Omn22, Omn23, Omn24, Omn25, Omn28	Buřňáček Monteirův ( <i>O. monteiroi</i> )	Bried <i>et al.</i> , 2012

**Tabulka č. 5:** Použité mikrosatelity z čeledi buňňákovití.

<b>Mikrosatelitní lokus</b>	<b>Donorový druh</b>	<b>Citace</b>
Paequ2, Paequ3, Paequ4, Paequ7, Paequ8, Paequ10, Paequ13	Buňňák bělobradý ( <i>Procellaria aequinoctialis</i> )	Techow <i>et</i> O’Ryan, 2004
Cd1, Cd2, Cd3, Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd10, Cd11	Buňňák šedý ( <i>Calonectris diomedea</i> )	Bried <i>et al.</i> , 2008
Tch6, Tch25	Buňňák taiko ( <i>Pterodroma magentae</i> )	Lawrence, 2008
Parm01, Parm02, Parm03, Parm04, Parm05, Parm06	Buňňák trinidadský ( <i>P. arminjoniana</i> )	Brown <i>et</i> Jordan, 2009
Puff 1,5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2F, Puff G11F, PuffPM2, Puff Sma6, Puff G2C	Buňňák baleárský ( <i>Puffinus mauretanicus</i> )	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
Bb2, Bb3, Bb7, Bb10, Bb11, Bb12, Bb20, Bb21, Bb22, Bb23, Bb25	Buňňák Bulwerův ( <i>Bulweria bulwerii</i> )	Andris <i>et al.</i> , 2010
Ptero01, Ptero02, Ptero03, Ptero04, Ptero05, Ptero06, Ptero07, Ptero08, Ptero09, Ptero10	Buňňák havajský ( <i>Pterodroma sandwichensis</i> )	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011
Patbel1, Patbel2, Patbel3, Patbel4, Patbel5, Patbel6, Patbel7		Quilfeldt <i>et al.</i> , 2012
Pacbel_00386, Pacbel_02653, Pacbel_03731, Pacbel_04240, Pacbel_04355, Pacbel_04991, Pacbel_07265, Pacbel_08509, Pacbel_08867, Pacbel_08988, Pacbel_09021, Pacbel_09528, Pacbel_09957, Pacbel_10033, Pacbel_10895, Pacbel_12344, Pacbel_15293, Pacbel_15327, Pacbel_16671, Pacbel_16989, Pacbel_17529, Pacbel_17944, Pacbel_17986, Pacbel_19907, Pacbel_20784	Buňňák útlozobý ( <i>Pachyptila belcheri</i> )	Moodley <i>et al.</i> , 2015

**Tabulka č. 6:** Použité mikrosatelity z řádů dlouhokřídlí a pěvci.

Mikrosatelitní lokus	Řád	Čeleď	Donorový druh	Citace
Cco5-21	Dlouhokřídlí	Alkovití	Alkoun obecný ( <i>Cepphus guillemonts</i> )	Friesen <i>et al.</i> , 2006
Calex-01		Kulíkovití	Kulík mořský ( <i>Charadrius alexandrinus</i> )	Brown <i>et Jordan</i> , 2009 podle Küpper <i>et al.</i> , 2007
RBG18, RBG18M, RBG29		Rackovití	Racek novozélandský ( <i>Larus novaehollandiae scopulinus</i> )	Lawrence, 2008, Welch <i>et Fleischer</i> , 2011 podle Given <i>et al.</i> , 2002
Dpμ01	Pěvci	Lesňáčkovití	Lesňáček žlutohý ( <i>Dendroica petechia</i> )	Friesen <i>et al.</i> , 2006 podle Dawson <i>et al.</i> , 1997

#### 4.7 Separace PCR produktů provedená za použití gelové elektroforézy

Pro elektroforetickou separaci byl použit 6% polyakrylamidový gel o tloušťce 0,4 mm. Po nachystání 2 skel o velikosti 330 x 390 mm a 330 x 420 mm byl mezi ně čerstvě namíchaný gel rovnoměrně nalit tak, aby nedošlo k vytvoření žádných mezer či vzduchových bublin. Jednotlivé PCR produkty byly po denuraci napipetovány do gelu a podrobeny separaci v elektroforetické komoře S2 (Whatman Biometra). Ve výsledku došlo k vizualizaci vzorků za použití redukce stříbrných iontů z AgNO<sub>3</sub>.

##### Příprava elektroforetického gelu

- 1) Plochy obou skel, které budou otočené k sobě a budou se dotýkat gelu, očistit 2x deionizovanou vodou a 2x 96% ethanolem. Následně vždy usušit pomocí papírových ubrousků.
- 2) Velké sklo v místě dotyku s gelem postříkat sprejem Rain-off sloužícím k odpuzování vody a důkladně ho rozetřít. Za 2 minuty přípravek opláchnout 2x deionizovanou vodou a opět usušit papírovým ubrouskem.
- 3) V digestoři na malé sklo rovnoměrně rozetřít kouskem papírového ubrousku 3 μl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu, který byl smíchán s 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové rozpuštěné v 96% ethanolu. Po 2 minutách opláchnout sklo 4x 96% ethanolem.

- 4) Na velké sklo v digestoři na polystyrenové desce přiložit malé sklo, aby obě ošetřené plochy skel byly směrem k sobě. Mezi ně jsou po delších okrajích skel umístěny 2 spacers, jejichž gumové zarážky jsou přitisknuty až těsně k okrajům malého skla. Přitisknutá skla k sobě v oblasti spacerů upevnit pomocí klipsů.
- 5) 60 ml akrylamidu (6%) a N,N'-metylenbisakrylamidu (19:1) v kádince smísit s 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného a 40  $\mu$ l N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu. Vzniklý roztok rovnoměrně nalít mezi obě skla za jemného poklepávání druhou rukou.
- 6) Po nalití gelu vsunout mezi skla očištěný hřebínek cca 5 mm hluboko a ten poté upevnit 4 většími klipsy. Gel nechat tuhnout nejméně 1 hodinu.

### **Separace a vizualizace PCR produktů**

- 1) Po zatuhnutí gelu sundat všechny klipsy a přebytečný polyakrylamidový gel očistit vodou pomocí kartáče.
- 2) Do elektroforetické komory následně umístit skla, kdy velké sklo bude vloženo směrem do místnosti a malé sklo přitisknuto k hliníkové desce komory.
- 3) Skla v komoře zajistit úchytkami se 4 šrouby. Skla se nacházejí v kontaktu s katodovým i anodovým prostorem, které se naplní 0,5x TBE. Opatrně vytáhnout hřebínek a prostor po jeho odstranění propláchnout pufrem od kousků gelu pomocí injekční stříkačky.
- 4) Zdroj stejnosměrného napětí (3000 V) připojit pomocí vodičů ke katodové a anodové části. Během 30 minut nechat gel zahřát při výkonu 90 W.
- 5) Dobu zahřívání gelu využít k přípravě vzorků a k nim napipetovat 5  $\mu$ l nanášecího pufru. Těsně před uplynutím nahřívání vzorky denaturovat a poté je okamžitě vtlačit do ledové tříště.
- 6) Elektroforetickou komoru po 30 minutách odpojit od zdroje a za použití injekční stříkačky a kousku plastu očistit od gelu skla v místě pro hřebínek. V této části maximálně 1 mm do hloubky co nejrychleji a rovnoměrně vsunout do gelu plastový hřebínek. Mezi jednotlivé zoubky hřebínku pipetovat po 2  $\mu$ l denaturovaných vzorků a nechat je dělit v elektroforetické komoře, Vzorky budou migrovat při 70 W, 150 mA a 3000 V podle délky PCR produktů po dobu 1,5–3 hodin.
- 7) Čas elektroforetického dělení využít k namíchání 4 roztoků pro jejich zviditelnění



v gelu - fix/stop roztok, 1% roztok HNO<sub>3</sub>, vývojka a 0,1% roztok dusičnanu stříbrného.

- 8) Po skončení elektroforézy vypustit celý objem pufru z vrchní elektrodové části do vaničky nacházející se v dolní části elektroforetické komory. Obě skla s gelem vytáhnout a položit na fotomisku obrácenou dnem vzhůru. Vložené spacers vysunout z jejich umístění a poté od sebe skla oddělit za použití nože.
- 9) Malé sklo nesoucí na sobě gel přesunout do fotomisky č. 1 a s přidaným fix/stop roztokem třepat 20 minut. Fix/stop roztok poté pomocí nálevky vlít opět do plastové baňky, ve které byl připraven a poté deionizovanou vodou 3x opláchnout sklo s gelem. S předpřipraveným roztokem 1% HNO<sub>3</sub> nechat sklo omývat po dobu 4 minut.
- 10) Roztok HNO<sub>3</sub> poté slít do dřezu a sklo s uchyceným gelem opláchnout 4x deionizovanou vodou. To následně dát do fotomisky č. 2 a společně s roztokem dusičnanu stříbrného, do kterého bylo předtím napipetováno 1200 µl formaldehydu a nechat poté omývat 30 minut.
- 11) Po tomto čase vlít roztok zpátky do skleněné nádoby pro opakované použití, dále umístit sklo s gelem na 5 vteřin do fotomisky č. 3, která je naplněna deionizovanou vodou. Sklo vložit do fotomisky č. 4 s vývojkou doplněnou 1200 µl formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného, nechat omývat do té doby, než budou produkty dostatečně vybarvené.
- 12) Reakci ukončit přidáním fix/stop roztoku, čímž se zastaví vizualizace PCR produktů v gelu. Roztok z fotomisky vylít do dřezu a sklo s přichyceným gelem vnořit zpět do fotomisky č. 3 naplněné deionizovanou vodou.
- 13) Gel usušit, pomocí A3 skeneru naskenovat do počítače a při podsvícení na negatoskopu vyhodnotit.

## 5 Výsledky

Laboratorní část mé bakalářské práce se zabývala nalezením polymorfních mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců nesyta afrického, při které byla využita metoda *cross-species* PCR amplifikace. Z testovaných 213 párů primerů bylo 6 párů primerů od 3 druhů ze 2 řádů - dlouhokřídlí a pěvci (5 a 1 pár primerů - viz Tabulka č. 6) a také dalších 207, které byly odvozeny od trubkonosých druhů (53 páru primerů - čeleď albatrosovití - viz Tabulka č. 3, 54 - čeleď buřňáčkovití - viz Tabulka č. 4 a 100 - čeleď buřňákovití - viz Tabulka č. 5).

První testování všech párů primerů proběhlo při teplotě *annealingu* 50 °C. V případě, že byly produkty v gelu velmi slabě viditelné, snižovala jsem teplotu postupně až na 44 °C. Když byly produkty velmi silné, teplotu *annealingu* jsem zvyšovala až na maximálních 68 °C. U vybraných mikrosatelitních lokusů (STAL8 a Ole10) jsem navýšila objem roztoku chloridu hořečnatého (25 mmol/l) o ½ (ze 4 µl na 6 µl, tedy koncentrace v PCR mixu vzrostla z 1,58 mmol/l na 2,37 mmol/l). Snižováním objemu vody byl zachován celkový objem PCR mixu.

Výsledkem mého experimentu bylo: 38 polymorfních mikrosatelitů, 5 mikrosatelitů bez produktu a 170 monomorfních. Přehled a charakteristiku polymorfních mikrosatelitů u nesyta afrického uvádím v Tabulce č. 7.

**Tabulka č. 7:** Souhrn 38 polymorfních mikrosatelitních lokusů testovaných u 6 nepříbuzných jedinců nesyta afrického (*Mycteria ibis*). V tabulce jsou uvedeny informace o názvu lokusu s kódem z databáze GenBank, zdrojovém druhu, sekvenci primerů, jednotce repetice, počtu alel, času separace a teplotě annealingu.

Mikrosatelitní lokus (GenBank <i>Acc. No.</i> )	Donorový druh	Primery (5'→3')	Repetiční jednotka	Počet alel	Čas ELFO [min]	T <sub>a</sub> [°C]
<b>De18</b> (AF096799)		F: TCCCTGTGTGGGTTTTTGAT R: CTAAGCCCAACACCAGAAGC	AC/AT	4	90	64
<b>10C5</b> (AY945750)		F: TGGAGATGCAATTGCCTAGA R: CAGATGAGGTTTTGGCCAGT	GA/GC/GT	3	90	65
<b>11H7</b> (AY945753)	Albatros stěhovavý	F: GCAAGCTAAGTTGGGGGTAA R: ACAGTAGGGCTGCTGCAGAT	AC	2	90	57
<b>11F3</b> (AY945751)		F: TTTCCAGCACATTCCAACAA R: GTTCAGCCAGAAAAGCAAGC	GA/GT/CT	4	120	56
<b>12H8</b> (AY945756)		F: CATGCCTGAATGCACTTTGT R: CACAATGGGTATAAGATTTTGCTG	GT/AT	2	120	64
<b>STAL8*</b> (nevedeno)	Albatros bělohřbetý	F: CCCTGCTGGGTTTCATTTTC R: CATTGTGCAGTAGGCATGG	TG	2	90	46
<b>Paequ3</b> (nevedeno)		F: TGTGGGTGCAGTAGAGCA R: CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	GA	3	180	65
<b>Paequ8</b> (nevedeno)	Buňák bělobradý	F: TATTCTGAGACTTGCGTTATCC R: GTGATCCATTAGTTGATGTCTACTG	CA	4	90	53
<b>Cd9</b> (EU029091)	Buňák šedý	F: TGGCAAAGGATCACGTTAGA R: CCAAAGGTTGCACATGAGTG	TG	2	120	56

Legenda: \* - zvýšená koncentrace roztoku chloridu hořečnatého (25mmol/l) v PCR mixu o 1/2 (z 1,58 na 2,37 mmol/l, resp. ze 4 na 6 µl)

Tabulka č. 7: Pokračování 1.

Mikrosatelitní lokus (GenBank <i>Acc. No.</i> )	Donorový druh	Primery (5'→3')	Repetiční jednotka	Počet alel	Čas ELFO [min]	T <sub>a</sub> [°C]
<b>Tch6</b> (neuveđeno)	Buňák taiko	F: GTTTCTTGGTGGTGGCTGAAGGTGTATG R: GCCATTTGAGAATGTTTCAGC	GT/GC	2	90	44
<b>Parm01</b> (neuveđeno)		F: CTGGACTCAGTGCCCTCTTC R: CAGGGCAGAAGCTCGTCTAT	CA	4	120	66
<b>Parm02</b> (neuveđeno)	Buňák trinidadský	F: AGCAAGCTGACAGCAACAGA R: TGTTATGTCCTGCGGATGAG	CA/TA	3	90	61
<b>Parm05</b> (neuveđeno)		F: CGTATACCCTGCAGATACGC R: CTCAGTGCCTGCAGATACCC	CA/GACA	2	90	44
<b>Parm06</b> (neuveđeno)		F: CACCAGTGTGAAGGAGTTGC R: TGTCTGTTGGCAGGTGAGAG	CA/GA /TACA	2	90	59
<b>Puff G2C</b> (EU158898)	Buňák baleárský	F: CTGAAATCAGACATTATTTC R: ACAATATGCAAACTTTTTG	GT	4	90	52
<b>Bb12</b> (HM171895)	Buňák Bulwerův	F: TCCCTTGAGTAGCAGGGAAC R: GGAGAAAGGGTCAAAATTGG	GA	2	120	52
<b>Bb21</b> (HM171897)		F: CTGATGTTCCAGGCCCTAAT R: CCTCTGAGCCAGCTAATTCC	TG	2	120	66
<b>Bb22</b> (HM171898)		F: TTCACAGCAGAATCACCTCAG R: GCTCAAAGGGTGGAAATTGTT	TG	5	120	63
<b>Bb23</b> (HM171899)		F: TCAAAGCTCACTCCCCTTT R: ATCTTCCCTTGCCTTCCTTT	CA	4	90	56

Tabulka č. 7: Pokračování 2.

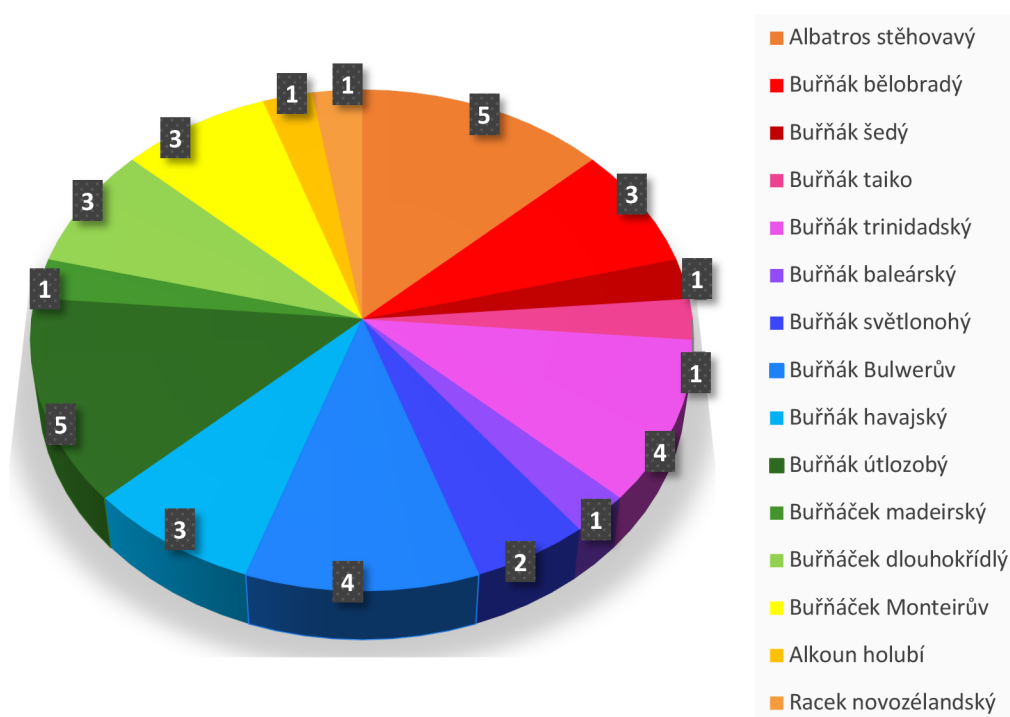
Mikrosatelitní lokus (GenBank <i>Acc. No.</i> )	Donorový druh	Primery (5'→3')	Repetiční jednotka	Počet alel	Čas ELFO [min]	T <sub>a</sub> [°C]
<b>Ptero01</b> (HQ918218)	Buňňák havajský	F: GAAAACAAC TCCCCACAAC R: TCCGTCAGACCTGCTGTATG	CA	4	120	66
<b>Ptero06</b> (HQ918223)		F: GTTCCATGGCGATGAAGG R: CTGAAAATGGCATCCAAACG	AAGG	3	180	57
<b>Ptero09</b> (HQ918226)		F: GCAAATACCAGTCTTCCAAAGG R: TTTAAGATAAAGATGTTTGAGAACCAC	AAGG	2	90	63
<b>Patbel2</b> (JF288776)	Buňňák útlozobý	F: GGTGTCATGCAACTGACTGAA R: CAATGGGAATGGCAGAGACT	CTAT	5	240	66
<b>Pc A105</b> (JX435471)	Buňňák světlonohý	F: ACAGGAAAGAGAAGAGGATTTG R: ATGGGGAGAGCGTATGTG	CA	2	120	56
<b>Pc D3</b> (JX435478)		F: CCTCTGCTCAAGTCTGTCAC R: AAACCTCCTTTGGGATGA	GATA/GAAA	3	180	57
<b>Pacbel_09021</b> (neuveđeno)	Buňňák útlozobý	F: ATCTGCGCATGCAGTGATAG R: CACAGCTAGCAGCATTGACC	GT	3	90	55
<b>Pacbel_09957</b> (neuveđeno)		F: GCTTTATTTAAGAGCAACAAAACTTC R: ACAAAGCAAACCTAATCATTCCC	GT	2	90	52
<b>Pacbel_15327</b> (neuveđeno)		F: TTCTTG TAGCAGTAGGAGACC R: ACCTCATGTGTAAAACCTGCC	CA	2	90	62
<b>Pacbel_19907</b> (neuveđeno)		F: TTTCTCCTTAGCTCGGCAGG R: CCATACTTGGTGGAGTGTG	AG	3	90	56

Tabulka č. 7: Pokračování 3.

Mikrosatelitní lokus (GenBank <i>Acc. No.</i> )	Donorový druh	Primery (5'→3')	Repetiční jednotka	Počet alel	Čas ELFO [min]	T <sub>a</sub> [°C]
<b>Oc79</b> (FJ238102)	Buňňáček madeirský	F: TATTCCTGGCCATGTTTTCC R: GCTTCCTTTGTTTCAGTTTAGA	AC	2	90	65
<b>Ole10*</b> (FR696386)		F: ACCAGCTCCTAACTGGAAGCCAC R: TGCAGGTAGGTTCTCAGTATGCAAAGG	CA	3	180	66
<b>Ole12</b> (FR696388)	Buňňáček dlouhokřídý	F: GCTCCTGTAGAGCTGGAAATGAACC R: GGCAGTGCTACCTGTGGATGC	AGAT/AGA /TACA	2	90	67
<b>Ole23</b> (FR696399)		F: TCTTTGGCATGCAATCTTTG R: CCCTGGTCAACTGAGAAAGC	GT	2	120	56
<b>Omn6</b> (JQ303230)		F: AGCCTACACCAGCAGAAGGA R: CCATACAGGCAACAATCACG	CA	4	120	52
<b>Omn8</b> (JQ303232)	Buňňáček Monteirův	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTA	AC	3	90	65
<b>Omn25</b> (JQ303242)		F: TCTGCTCCCCCTGATTATTG R: ACTCTGAGAGCCATCCATCA	ATGG	3	120	63
<b>Cco5-21</b> (neuvedeno)	Alkoun holubí	F: TCAAGATGATGAAGACCCTAAT R: AGAGTTGCACAGGTAAATACC	(neuvedeno)	2	90	58
<b>RBG29</b> (AY091852)	Racek novozélandský	F: CCTAGCTTTTTGGACTCAGT R: GTGGTGTGCAATAGGATTC	GT	3	90	62

Legenda: \* - zvýšená koncentrace roztoku chloridu hořečnatého (25mmol/l) v PCR mixu o 1/2 (z 1,58 na 2,37 mmol/l, resp. ze 4 na 6 µl)

Z 213 mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců nesya afrického (*Mycteria ibis*) vykazovalo polymorfismus 38 z nich, úspěšnost nalezení byla 17,84 %. Z těchto polymorfních mikrosatelitních lokusů jich 36 bylo odvozeno od zástupců z řádu trubkonosí a 2 od zástupců z řádu dlouhokřídlí. Z čeledi albatrosovití bylo polymorfních 6 (z 53) mikrosatelitních lokusů, jedná se tedy o 11,32% úspěšnost. Čeled buňákovití poskytla celkem 23 mikrosatelitů (ze 100), které vykazovaly polymorfni produkt (tj. 23,00 %) a z poslední čeledi buňáčkovití bylo polymorfních 7 lokusů (z 54), tedy 12,96 %. Druhy poskytující polymorfni mikrosatelity u nesya afrického uvádím v diagramu na Obrázku č. 3.



**Obrázek č. 3:** Přehled 38 polymorfních mikrosatelitních lokusů u nesya afrického, které byly odvozeny z DNA zástupců z řádů trubkonosí a dlouhokřídlí. Každé číslo vyjadřuje daný počet polymorfních mikrosatelitů u nesya afrického.

V rámci mých experimentů bylo u jednotlivých testovaných mikrosatelitů objeveno 2–5 alel. 2 alely byly nalezeny u 17 mikrosatelitů, 3 alely u 11 mikrosatelitů, 4 alely u 8 mikrosatelitů a 5 alel bylo zaznamenáno celkem u 2 lokusů (Bb22 a Patbel2). V Tabulce č. 8 jsou genotypy všech mikrosatelitů poskytujících polymorfni produkt.

**Tabulka č. 8:** Souhrn genotypů 38 polymorfních mikrosatelitních lokusů u nesyta afrického.

Mikrosatelitní lokus	Počet alel	Počet genotypů	Heterozygotnost	Genotyp jedince č.					
				1	2	3	4	5	6
De18	4	3	1	2/3	3/4	3/4	1/2	1/2	2/3
10C5	3	4	2/3	2/3	2/3	2/2	1/1	1/2	2/3
11H7	2	3	2/3	1/2	1/2	1/2	2/2	1/2	1/1
11F3	4	4	2/3	2/3	2/3	3/3	1/2	3/3	2/3
12H8	2	2	1/3	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/2
STAL8	2	2	1/6	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2
Paequ3	3	3	2/3	2/3	2/2	1/2	2/3	2/2	2/3
Paequ8	4	4	1	1/3	1/3	2/3	1/3	1/4	1/2
Cd9	2	2	1/3	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1
Tch6	2	2	1/6	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2
Parm01	4	4	1/6	3/3	2/2	2/2	1/3	4/4	3/3
Parm02	3	3	1/2	3/3	3/3	2/3	1/2	2/3	3/3
Parm05	2	3	1/2	1/2	2/2	1/2	1/1	2/2	1/2
Parm06	2	2	2/3	1/2	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2
Puff G2C	4	4	2/3	3/3	3/4	3/4	2/4	3/3	1/3
Pc A105	2	2	2/3	1/2	2/2	1/2	1/2	1/2	2/2
Pc D3	2	2	1/3	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1
Bb12	2	3	1/2	1/2	1/2	1/1	1/2	2/2	2/2
Bb21	2	2	2/3	1/2	1/1	1/1	1/2	1/2	1/2
Bb22	5	5	1	2/4	1/3	1/2	4/5	2/4	3/4
Bb23	4	5	2/3	3/4	3/4	1/4	2/2	3/5	3/3
Ptero01	4	4	1/6	3/3	2/2	2/2	1/3	4/4	3/3
Ptero06	3	4	1/3	2/2	3/3	2/3	2/3	3/3	1/1
Ptero09	2	3	1/2	1/2	1/2	1/1	1/2	1/1	2/2
Patbel2	5	6	1	1/5	2/3	3/5	3/4	2/5	1/2
Pacbel_09957	2	2	1/3	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/2
Pacbel_15327	2	2	1/6	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1
Pacbel_19907	3	4	2/3	1/2	3/3	1/3	1/2	3/3	2/3



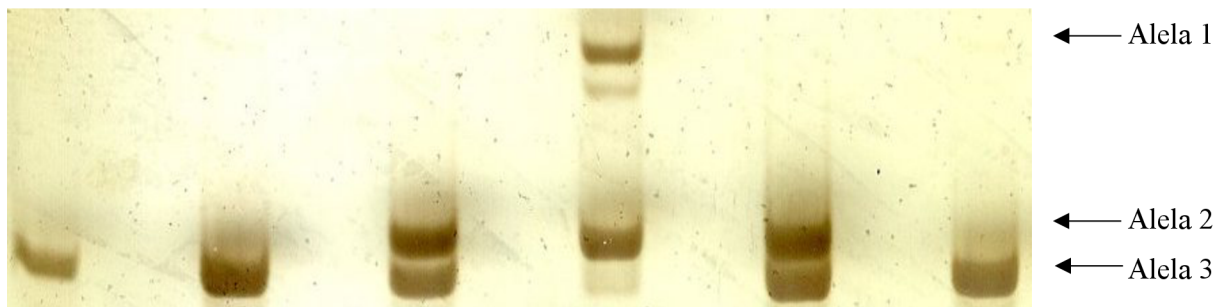
Tabulka č. 8: Pokračování.

Mikrosatelitní lokus	Počet alel	Počet genotypů	Heterozygotnost	Genotyp jedince č.					
				1	2	3	4	5	6
Oc79	2	2	0	1/1	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1
Ole10	3	4	1/6	3/3	2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
Ole12	2	2	1/6	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2
Ole23	2	2	1/3	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1
Omn6	4	4	2/3	1/4	1/4	1/1	2/3	1/4	4/4
Omn8	3	3	2/3	3/3	2/3	2/3	1/3	3/3	2/3
Omn25	3	3	1/6	2/2	2/2	2/2	1/3	2/2	1/1
Cco5-21	2	2	1/3	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	1/1
RBG29	3	5	1/3	2/3	1/1	1/3	2/2	3/3	2/2

Při hodnocení jednotlivých mikrosatelitních lokusů bylo nutné určit jejich optimální teplotu *annealingu* a dobu elektroforetické separace. Nezanedbatelný počet mikrosatelitů neobsahoval pouze PCR produkty alel, ale v gelu se objevily i další nespecifické produkty, které dělají vyhodnocení problematickým. Jedním z takových mikrosatelitů byl např. lokus De18, který sice poskytoval polymorfní produkt, ale konečné vyhodnocení genotypů v elektroforetogramu bylo velmi obtížné. K dalším analýzám bych ho nedoporučila. Mikrosatelity vhodnější k preciznějšímu určení genetických vztahů mezi jedinci jsou např. Ptero09 (na Obrázku č. 4), Parm02 (na Obrázku č. 5) a Puff G2C (na Obrázku č. 6).



**Obrázek č. 4:** Příklad dvoualelového mikrosatelitního lokusu Ptero09 amplifikovaného při teplotě *annealingu* 63 °C. Amplifikace proběhla u 6 nepříbuzných jedinců nesyta afrického během 90 minut. Černé šipky znázorňují Alely 1 a 2.



**Obrázek č. 5:** Mikrosatelitní lokus Parm02 se 3 alelami amplifikovaný při teplotě 61 °C na DNA 6 nepříbuzných jedinců nesyta afrického separovaný po dobu 90 minut. Alely 1–3 jsou znázorněné šipkami.



**Obrázek č. 6:** Čtyřalelový mikrosatelitní lokus Puff G2C separovaný při teplotě 51 °C po dobu 150 minut. Mikrosatelit byl testován u 6 nepříbuzných jedinců nesyta afrického. Šipkami jsou znázorněné Alely 1 až 4.

## 6 Diskuze

V laboratorní části v mé bakalářské práci jsem měla za úkol nalézt mikrosatelitní lokusy poskytující polymorfni produkty metodou *cross-species* PCR amplifikace. K testování jednotlivých mikrosatelitů jsem využila DNA 6 nepříbuzných jedinců nesya afrického. Polymorfni produkt poskytl 38 mikrosatelitů po 2–5 alelách. Vypovídací hodnota však byla různá např. mikrosatelitový lokus De18, který byl sice polymorfni, ale velmi těžko hodnotitelný, proto bych ho nepoužila např. k paternitním analýzách. V rámci *cross-species* analýzy je běžné, že ne všechny mikrosatelity vykazují polymorfismus či jsou zcela hodnotitelné (viz články Burg *et Croxall* (2004), Lawrence (2008), Andris *et al.* (2010), Quillfeldt *et al.* (2012), Moodley *et al.* (2015)).

Z čeledi albatrosovití jsem postupně amplifikovala 53 párů primerů. V následující PCR amplifikaci a elektroforetické separaci poskytl polymorfismus pouze 6 z nich (De18, 10C5, 11H7, 11F3 a 12H8 - albatros stěhovavý a STAL8 - a. bělohřbetý).

Z čeledi buňňákovití jsem celkem ze 100 párů primerů získala 23 mikrosatelitních lokusů poskytujících polymorfni produkt (Cd9 - od buňňáka šedého, Tch6 - od b. taiko, Parm01, Parm02, Parm05 a Parm06 - b. trinidatský, Puff G2C - b. baleárský, Bb12, Bb21, Bb22 a Bb23 - b. Bulwerův, Ptero01, Ptero06 a Ptero09 - b. havajský, Pc A105 a Pc D3 - b. světlonohý a Patbel2, Pacbel\_09021, Pacbel\_09957, Pacbel\_15327 a Pacbel\_19907 - b. útlozobý).

Z čeledi buňňáčkovití jsem měla k dispozici 54 párů primerů. Při jejich testování se vyskytl polymorfni produkt u 7 lokusů (Oc79 - buňňáček madeirský, Ole10, Ole12 a Ole23 - b. dlouhokřídly, Omn6, Omn8 a Omn25 - b. Monteirův a Paequ3 a Paequ8 - b. bělobradý).

Z řádu dlouhokřídli jsem testovala 5 párů primerů, kdy 2 mikrosatelity byly polymorfni (Cco5-21 - alkoun holubí a RBG29 - racek novozélandský).

V následující Tabulce č. 9 jsou porovnány výsledné hodnoty teplot annealingu a počtu alel originálních publikací, které popsaly testované mikrosatelity, společně s výsledky mých experimentů.

**Tabulka č. 9:** Mikrosatelity poskytující polymorfismus u nesyta afrického, které byly testovány v mé bakalářské práci a srovnání s originálními publikacemi.

Mikrosatelitní lokus	Donorový druh	NS (6)	NL	T <sub>a</sub> S [°C]	T <sub>a</sub> L [°C]	Citace
De18		4	5 (90)	64	48 52	Burg, 1999
10C5	Albatros stěhovavý	3	3 (60)	65	58	Dubois <i>et al.</i> , 2005
11H7		2	10 (60)	57	58	
11F3		4	3 (60)	56	58	
12H8		2	5 (60)	64	58	
STAL8*	Albatros bělohřbetý	2	M (36) M (12)	46	60	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
Paequ3	Buňák	3	9 (93)	65	60	Techow <i>et O`Ryan</i> , 2004
Paequ8	bělobradý	4	3 (77)	53	60	
Cd9	Buňák šedý	2	4 (-)	56	58	Bried <i>et al.</i> , 2008
Tch6	Buňák taiko	2	2 (143)	44	57	Lawrence, 2008
Parm01		4	8 (260)	66	-	Brown <i>et Jordan</i> , 2009
Parm02	Buňák	3	9 (260)	61	-	
Parm05	trinidadský	2	M (-)	44	-	
Parm06		2	M (-)	59	-	
Puff G2C	Buňák baleárský	4	7 (50)	52	50	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
Pc A105	Buňák světlonohý	2	8 (84)	56	56,7 56,9	Hardesty <i>et al.</i> , 2013
Pc D3		2	6 (84)	57	55,4 56	
Bb12		2	5 (91)	52	58	Andris <i>et al.</i> , 2010
Bb21	Buňák	2	3 (91)	66	58	
Bb22	Bulwerův	5	2 (91)	63	58	
Bb23		5	3 (91)	56	58	
Ptero01	Buňák havajský	4	3 (40)	66	53	Welch <i>et Fleischer</i> , 2011
Ptero06		3	9 (40)	57	53	
Ptero09		2	7 (40)	63	53	
Patbel2		5	16 (68)	66	-	Quilfeldt <i>et al.</i> , 2012
Pacbel_09021	Buňák útlozobý	3	17 (76)	55	56	Moodley <i>et al.</i> , 2015
Pacbel_09957		2	10 (73)	52	56	
Pacbel_15327		2	8 (75)	62	56	
Pacbel_19907		3	8 (74)	56	56	
Oc79	Buňáček madeirský	2	2 (27)	65	50	Sun <i>et al.</i> , 2009
Ole10*	Buňáček dlouhokřídlý	3	3 (24)	66	60	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
Ole12		2	6 (47)	67	60	
Ole23		2	10 (24)	56	60	

Tabulka č. 9: Pokračování.

Mikrosatelitní lokus	Donorový druh	NS (6)	NL	T <sub>a</sub> S [°C]	T <sub>a</sub> L [°C]	Citace
Omn6	Buňňáček Monteirův	4	9 (125)	52	58	Bried <i>et al.</i> , 2012
Omn8		3	10 (125)	65	58	
Omn25		3	5 (125)	63	58	
Cco5-21	Alkoun holubí	2	–	58	50	Friesen <i>et al.</i> , 2006
RBG29	Racek novozélandský	3	14 (40)	62	53	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011

Legenda: (–) - lokusy, kde nebyl uveden celkový počet alel či teplota *annealingu*, NS - počet alel v mé práci, NL - počet alel v originálních publikacích, (T<sub>a</sub>S) - teplota anealingu PCR v mé práci, (T<sub>a</sub>L) - teplota anealingu PCR v publikacích, () počet jedinců, kteří byli testováni pro daný lokus.

Při srovnání jednotlivých mikrosatelitních lokusů jsem zjistila, že se v mých experimentech na 6 jedincích nesyta afrického povedlo získat větší počet alel u celkem 8 mikrosatelitů, než uvádějí originální publikace.

U mikrosatelitu 11F3 jsem po jeho amplifikaci nalezla 4 alely, zatímco Dubois *et al.* (2005) u tohoto lokusu objevili pouze 3 alely při testování na 60 jedincích albatrosa stěhovavého.

Po separaci mikrosatelitního lokusu STAL8 jsem u něho detekovala 3 alely. Hernandez *et al.* (2014) amplifikovali tento mikrosatelit při teplotě *annealingu* 60 °C na 51 nepříbuzných jedincích albatrosa bělohřbetého. Mikrosatelit byl polymorfní se 2 alelami.

U mikrosatelitu Paequ8 jsem po rozdělení PCR produktů nalezla 4 alely. Techow *et* O’Ryan (2004) detekovali u stejného mikrosatelitu na 77 jedincích buňňáka bělobradého 3 alely.

Po amplifikaci lokusů Parm05 a Parm06 jsem u obou našla po 2 alelách. Brown *et* Jordan (2009) vyhodnotili oba tyto mikrosatelity u buňňáka trinidadského jako monomorfní.

U mikrosatelitů Bb22 a Bb23 jsem objevila po 5 alelách, ale Andris *et al.* (2010) u těchto lokusů testovaných na 91 jedincích buňňáka Bulwerova amplifikovali 2 a 3 alely.

Po elektroforéze mikrosatelitního lokusu Ptero01 jsem u něho vyhodnotila 4 alely. Welch *et* Fleischer (2011) detekovali 3 alely u 40 jedinců buňňáka havajského.

Celkem jsem nalezla u nesyta afrického 38 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Tyto mikrosatelity jsem srovnala s výsledky dalších 11 druhů ze skupiny

Aequorlitorornithes, na kterých bylo těchto 38 mikrosatelitů také testováno. 8 mikrosatelitů, které jsem u nesyta afrického označila za polymorfni, nevykazovaly polymorfismus u žádného z těchto 11 druhů. Jedná se o mikrosatelity Parm06, Bb12, Ptero01, Ptero06, Ole12, Ole23, Omn6 a Cco5-21. U 5 z těchto mikrosatelitů byly detekovány 2 alely, avšak u Ptero06 byly nalezeny 3 alely a u Ptero01 a Omn6 4 alely. V případě toho, že mikrosatelit polymorfni u nesyta afrického byl polymorfni alespoň u 1 dalšího druhu, jsou tyto mikrosatelity uvedeny v Tabulce č. 10. Druhy jsou v tabulce seřazeny zleva doprava podle klesajícího počtu polymorfni mikrosatelitů (kromě nesyta afrického). Shora dolů jsou mikrosatelity řazeny dle klesajícího počtu druhů, u kterých vykazovaly polymorfismus. Ze zmíněných 11 druhů nejvíce mikrosatelitů, které byly polymorfni u nesyta afrického, bylo polymorfni u nesyta indomalajského. Druhý největší překryv mikrosatelitů je dále u čápa simbila, avšak další čápi (bílý a černý) jsou překvapivě až za pelikánem bílým a oběma testovanými plameňáky. Zajímavostí je, že 3 druhy pelikánů (skvrnozobý, africký a kadeřavý) vyšly s nejmenším překryvem mikrosatelitů, naopak pelikán bílý vyšel jako třetí nepřekryvnější v rámci těchto polymorfni mikrosatelitů.

**Tabulka č. 10:** Souhrn mikrosatelitních lokusů poskytujících polymorfni produkt v mé bakalářské práci u nesyt afrického (NA) a srovnání jejich polymorfismu s dalšími 11 druhy kladu Aequorlitornithes. Nesyt indomalajský (NI; Nedvědová, 2015), čáp simbil (ČS; Kopecký, 2022), pelikán bílý (PB; Adámková, 2021), plameňák karibský (PK; Strejčková, 2018), plameňák růžový (PR; Zlochová, 2019), čáp bílý (ČB; Krňávková, 2023), čáp černý (ČČ; Musilová, 2022), potápka roháč (PH; Janušová, 2019), pelikán skvmozobý (PS; Macková, 2023), pelikán africký (PA; Kopečná, 2020) a pelikán kadeřavý (PD; Verešová, 2019).

Mikrosatelitní lokus	NA (6)	NI (6)	ČS (6)	PB (21)	PK (30)	PR (22)	ČB (23)	ČČ (6)	PH (6)	PS (6)	PA (12)	PD (22)	Σ <sub>P</sub>
Omn8	3	4	6	7	7	8	6	3	6	4	4	M	11
Patbel2	5	5	4	5	M	M	M	M	5	3	2	M	7
Paequ3	3	2	M	4	3	3	M	M	M	3	3	M	7
Paequ8	4	M	2	2	3	M	M	M	M	M	3	M	5
Bb21	2	M	2	M	M	M	M	M	5	2	M	2	5
Bb22	5	2	M	M	2	2	2	M	M	M	M	M	5
Ptero09	2	2	3	4	M	M	4	M	M	M	M	M	5
11H7	2	2	2	M	M	M	M	4	M	M	M	M	4
STAL8	2	2	M	M	M	M	M	2	2	M	M	M	4
Tch6	2	3	M	3	M	4	M	M	M	M	M	M	4
Parm02	3	4	M	4	M	M	3	M	M	M	M	M	4
Puff G2C	4	3	2	M	M	M	4	M	M	M	M	M	4
Pc D3	2	2	M	M	M	2	M	M	3	M	M	M	4
Pacbel_09021	3	2	M	M	3	4	M	M	M	M	M	M	4
Pacbel_19907	3	2	2	M	M	M	M	2	M	M	M	M	4
Omn25	3	2	3	M	M	M	M	2	M	M	M	M	4
RBG29	3	4	M	M	7	8	M	M	M	M	M	M	4
10C5	3	2	M	M	M	M	M	4	M	M	M	M	3
12H8	2	2	M	M	M	2	M	M	M	M	M	M	3
Parm01	4	3	M	M	7	M	M	M	M	M	M	M	3
Parm05	2	3	M	M	M	M	2	M	M	M	M	M	3
Pacbel_15327	2	2	M	M	M	M	M	M	M	5	M	M	3

Tabulka č. 10: Pokračování.

Mikrosatelitní lokus	NA (6)	NI (6)	ČS (6)	PB (21)	PK (30)	PR (22)	ČB (23)	ČČ (6)	PH (6)	PS (6)	PA (12)	PD (22)	Σ <sub>p</sub>
Oc79	2	M	M	2	2	M	M	M	M	M	M	M	3
De18	4	4	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	2
11F3	4	M	M	M	M	M	M	2	M	M	M	M	2
Cd9	2	M	M	M	M	M	M	M	6	M	M	M	2
Pc A105	2	2	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	2
Bb23	5	M	M	M	M	M	2	M	M	M	M	M	2
Pacbel_09957	2	2	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	2
Ole10	3	M	2	M	M	M	M	M	M	M	M	M	2
<b>Σ</b>	<b>38</b>	<b>23</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	

Legenda: M - monomorfní mikrosatelitní lokus, () - počet jedinců, na kterých byl zjištěn počet alel u polymorfních mikrosatelitů, Σ<sub>p</sub> - počet druhů, u kterých mikrosatelitní lokus vykazoval polymorfismus, Σ - počet mikrosatelitů, které byly polymorfní u konkrétního srovnávaného druhu.



V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci byl před mými testy nesyť africký zkoumán pouze ve 2 pracích (Janyšková, 2014; Sopko, 2014). Dohromady tyto studentky otestovaly celkem 426 mikrosatelitů z řádů čápi (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), potáplice (Gaviiformes), veslonoží (Pelecaniformes) a vrubozobí (Anseriformes). Zařazení ptáků do řádů Ciconiiformes a Pelecaniformes autorky chápou v pojetí starého systému. Počet lokusů, které poskytly polymorfismus, se rovnal hodnotě 100, tedy úspěšnost nalezení polymorfního lokusu byla 23,47 %. Se zahrnutím mé práce byl testovaný počet lokusů z řádu čápi (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), potáplice (Gaviiformes), trubkonosí (Procellariiformes), veslonoží (Pelecaniformes) a vrubozobí (Anseriformes) 639 (polymorfních 138, tj. úspěšnost 21,60 %). Ve všech třech případech se jedná pouze o předběžné výsledky, ale až genotypizace na větším počtu nepříbuzných jedinců dají přesnější data.

V následných budoucích analýzách bych navrhovala otestovat na nesyť africkém zbylé páry primerů, které jsou v rámci laboratoře k dispozici. Jedná se především o mikrosatelity, které byly popsány u řádů plameňáci a veslonoží, avšak měly by být otestovány i další páry primerů, které byly izolovány z řádu tučňáci. Dále by bylo vhodné se zaměřit na univerzální ptačí mikrosatelitní lokusy (Dawson *et al.*, 2010; Dawson *et al.*, 2013). Zcela jistě by měly být otestovány mikrosatelity publikované u čápa bílého (Turjeman *et al.*, 2016), jelikož je tento druh čápu zařazen do totožné čeledě jako nesyť africký a tyto mikrosatelity u nesyť afrického dosud analyzovány nebyly. Je tedy velká šance, že tyto by mohly vykazovat u tohoto druhu polymorfismus.

## 7 Závěr

Moje bakalářská práce vypracovaná na Katedře buněčné biologie a genetiky se věnovala hledání polymorfních mikrosatelitů za využití 213 párů primerů na DNA 6 nepříbuzných jedincích nesyta afrického. Celkem polymorfismus poskytlo 38 lokusů, dalších 170 poskytlo monomorfní produkt a posledních 5 mikrosatelitů bylo bez produktu. Během každého následného experimentu byla teplota annealingu buď zvyšována (až 68°C) anebo snižována (až 44 °C) podle potřeby. K dalšímu použití byly vybrány pouze mikrosatelity s dobře hodnotitelnými PCR produkty.

V rámci mých experimentů jsem u polymorfních mikrosatelitů našla 2–5 alel. Nejvíce jsem našla po 5 alelách, a to u Bb22, Bb23 od buňáka Bulwerova a Patbel2 od buňáka útlozobého. Největší zastoupení v rámci polymorfních lokusů měly lokusy dvoualelové.

## 8 Literatura

- Adámková, V. (2021): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuscript [online]; [navštíveno 20. 8. 2022] Dostupné z <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>.
- Avvaru, A. K., Sharma, D., Verma, A., Mishra, R. K., Sowpati, D. T. (2020): MSDB: a comprehensive, annotated database of microsatellites. Nucleic Acids Research 48, 155–159.
- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G. M., Bered, F., Fay, M. F., Lexer, C. (2007): Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Molecular Ecology 16, 3759–3767.
- Barbraud C., Barbraud J.-C., Barbraud M. 1999. Population dynamics of the White Stork *Ciconia ciconia* in western France. Ibis 141, 469–479.
- Bennett, P. (2000): Demystified...Microsatellites. Molecular Pathology 53, 177–183.
- Bicknell, A. W. J., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Knight, M. E., Bilton, D. T., Votier, S. C. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's stormpetrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). Conservation Genetics Resources 3, 711–716.
- Bried, J., Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuscript [online]; [navštíveno 20. 8. 2022] Dostupné z <https://www.yumpu.com/en/document/view/39976169>
- Bried, J., Dubois, M. P., Jouventin, P., Santos, R. S. (2008): Eleven polymorphic microsatellite markers in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*, and cross-species amplification on threatened Procellariiformes. Molecular Ecology Resources 8, 602–604.

- Brown, L. H., Urban, E. K., Newman, K. (1993): The birds of Africa. Vol. 1, Academic Press, London, 172–190.
- Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009): Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology* 150, 925–929.
- Burg, T. M., (1999) Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology* 8, 338–341.
- Burg T. M., Croxall J. P. (2001): Global relationships amongst black-browed and grey-headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. *Molecular Ecology* 10, 2647–2660.
- Burg T. M., Croxall J. P. (2004): Global population structure and taxonomy of the wandering albatross species complex. *Molecular Ecology* 13, 2345–2355.
- Dawson, A. D., Ball, D. A., Spurgin, L., Martín-Gálvez, D., Stewart, K. R. I., Horsburgh, J. G., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, J. W. A., Preston, A. J. S., Ekblom, R., Slate, J., Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics* 17, 1–22.
- Dawson, A. D., Horsburgh, J. G., Küpper, C., Stewart, K. R. I., Ball, D. A., Durrant L. K., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Kleins, Á., Krupa, P. A., Lee, J., Martín-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, G. L., Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources* 10, 475–494.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity* 79, 506–514.
- Dubois M. P., Jarne P., Jouventin P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes* 5, 905–907.
- del Hoyo, J. (2020): All the Birds of the World. First edition. Lynx Edicions, Spain.
- del Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J. (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona, 436–465.

- Ellegren, H. (1992): Polymerase-Chain-Reaction (PCR) Analysis of Microsatellites: A New Approach to Studies of Genetic Relationships in Birds. Oxford University Press 109, 886–895.
- Ellegren, H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5, 435–445.
- Gadgil, R. Y., Romer, E. J., Goodman, C. C., Shin-ya, K., Hanenberg, H., Leffal, M. (2020): Replication stress at microsatellites causes DNA double-strand breaks and break-induced replication. *DNA and Chromosomes* 295, 15378–15397.
- Gaisler, J., Zima, J. (2018): *Zoologie obratlovců*. Vydání 3., přepracované. Academia, Praha, 463–488.
- Galbusera, P., van Dongen, S., Matthysen, E. (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1, 163–168.
- Gill, F., Donsker, D. (2022): IOC World Bird list (v12.1) [online]; [navštíveno 6. 11. 2022] Dostupné z <https://www.worldbirdnames.org/bow/storks/>.
- Goldstein, D. B., Pollock, D. D. (1997): Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. *The Journal of Heredity* 88, 335–342.
- Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwaters, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources* 9, 1044–1046.
- Hamilton, M. B., Pincus, E. L., Di Fiore, A., Fleischer R. C. (1999): Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* 27, 501–507.
- Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2013): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources* 5, 27–29.
- Hernandez, L. D., Lounsberry, Z. T., Collins, P. W., Henry, R. W., Newsome, S. D., Sacks, B. N. (2014): Development and characterization of 15 polymorphic microsatellite markers for North Pacific albatrosses using paired-end Illumina shotgun sequencing. *Conservation Genetics Resources* 6, 491–493.

- Huang, J., Li, WJ., Jian, ZY., Yue, BS., Yan, YF. (2016): Genome-wide distribution and organization of microsatellites in six species of birds. *Biochemical Systematics and Ecology* 67, 95–102.
- Hudec, K., Šťastný, K., Cepák, J., Čihák, K., Honza, M., Hořák, D., Hromádka, M., Klvaňa, P., Musil, P., Musilová, Z. (2016): Ptáci - Aves. Díl I. Vydání 3., přepracované a doplněné. Academia, Praha, 577–579.
- Janušová, D. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kahl, M. P. (1979): Family Ciconiidae: In: Mayr, E., Cottrell, G. W. (Eds): Peter Check List of Birds of the World. Vol. 2. Museum of Comparative Zoologie, Cambridge.
- Kopecký, O. (2022): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kopečná, K. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Krňávková, P. (2023): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Lawrence, H. A. (2008): Conservation Genetics of the World's Most Endangered Seabird, the Chatham Island Tāiko. Disertační práce. Auckland, Nový Zéland, Massey University [online]; [navštíveno 8. 11. 2022] Dostupné z <http://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>.
- Macková, B. (2021): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimanda, G. K., Thali, M. R., Alderman, R., Cuthbert, R. J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Phillips, R. A., Ryan, P. G., Suazo, C. G., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015):

- Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources* 15, 1046–1058.
- Musilová, K. (2022): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa černého (*Ciconia nigra*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Nedvědová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Neff, B. D., Gross, M. R. (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55, 1717–1733.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294–307.
- Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P, Møller, A. P, Ellegren, H. (1996): Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* 7, 471–482.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology* 153, 367–373.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener, S., Krawetz, S. A (Eds.): *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, 365–386.
- Sheldon, F. H., Slikas, B. (1997): Advances in Ciconiiformes Systematics 1976–1996. *Colonial Waterbirds* 20, 106–114.
- Sia, E. A., Butler, C. A., Dominska, M., Greenwell, P., Fox, T. D., Petes, T. D. (2000): Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 250–255.
- Slikas, B. (1997): Phylogeny of the avian family Ciconiidae (Storks) based on cytochrome b sequences and DNA-DNA hybridization distances. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8, 275–300.

- Strejčková, B. (2018): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů od trubkonosých u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. *Molecular Ecology Resources* 9, 913–915.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463–6471.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004) Characterization of microsatellite loci in Whitechinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-species amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes* 4, 33–35.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10, 967–981.
- Turjeman, S. F., Centeno-Cuadros, A., Nathan, R. (2016): Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite markers for the white stork, *Ciconia ciconia*: applications in individual-based and population genetics. *Animal Biodiversity and Conservation*, 39, 11–16.
- Verešová, D. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) a u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources* 3, 581–584.
- Winkler, D. W., Billerman, S. M., Lovette, I. J., Pegan, T. M., Atkins, N. (2015): Bird families of the world: an invitation to the spectacular diversity of birds. Lynx Edicions, Barcelona, 23, 173.
- Wu, X., Zhou, L., Zhao, X., Tan, Z. (2014): The analysis of microsatellites and compound microsatellites in 56 complete genomes of Herpesvirales. *Gene* 551, 103–109.
- Zlochová, A. (2019): Amplifikace vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.