

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2024**

**Karolína Musilová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Analýza a charakteristika vybraných polymorfních  
mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa černého  
(*Ciconia nigra*)**

**Diplomová práce**

**Bc. Karolína Musilová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2024    Vedoucí práce: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Karolína MUSILOVÁ  
Osobní číslo: R220576  
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa černého (*Ciconia nigra*).  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce: charakteristika testovaného druhu, mikrosatelity polymorfni u druhů rodu *Ciconia* s důrazem na čápa černého.
3. Amplifikace a charakteristika vybraných mikrosatelitových lokusů na DNA 23 nepříbuzných jedinců čápa černého; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfni v bakalářské práci autorky (Musilová, 2022) a mikrosatelitů popsaných pro čápa bílého v publikaci Feldman Turjeman *et al.* (2016).

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové 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.
6. Feldman Turjeman, S., 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*, 39.1, 11-16.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: 22. listopadu 2022  
Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

L.S.

---

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

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 23. listopadu 2022

## **Bibliografické údaje**

**Jméno a příjmení autora:** Bc. Karolína Musilová

**Název práce:** Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa černého (*Ciconia nigra*)

**Typ práce:** Diplomová

**Pracoviště:** Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

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

**Rok obhajoby:** 2024

### **Souhrn:**

V této diplomové práci jsem se věnovala analýze a charakteristice vybraných polymorfních mikrosatelitů, které byly nalezeny u čápa černého (*Ciconia nigra*).

V teoretické části jsem popsala fylogenetické vztahy uvnitř rodu *Ciconia*, charakterizovala jsem čápa černého včetně jeho hnízdění, migrace, rozšíření, rozmnožování, shánění potravy, karyotypu a mitochondriálního genomu. Další kapitoly se zabývaly mikrosatelity, *de novo* izolovanými mikrosatelity pro druhy čeledi Ciconiidae a mikrosatelity z řádu Procellariiformes využitými pro *cross-species* PCR amplifikaci.

V experimentální části jsem *cross-species* PCR amplifikací a za využití populačně genetických programů charakterizovala na genomické DNA 24 nepříbuzných jedinců čápa černého mikrosatelitové lokusy, které byly u tohoto druhu polymorfní v mé bakalářské práci (Musilová, 2022). Celkem 15 lokusů bylo polymorfní se 2–6 alelami. Tyto lokusy jsem genotypovala a popsala jsem jejich populačně genetické vlastnosti. Mezi žádnými lokusy nebyla detekována vazba, ale 1 lokus (Ole26) byl vázán na pohlavní chromozom Z. Dále jsem otestovala 11 mikrosatelitů izolovaných od čápa bílého na polymorfismus u čápa černého. Žádný z nich nebyl polymorfní.

**Klíčová slova:** Čáp černý (*Ciconia nigra*), mikrosatelity, *cross-species* PCR amplifikace, trubkonosí

**Počet stran:** 63

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** Český

## **Bibliographical identification**

**Author's first name and surname:** Bc. Karolína Musilová

**Title of thesis:** The analysis and characterization of selected polymorphic microsatellites from order Procellariiformes in Black Stork (*Ciconia nigra*)

**Type of thesis:** Master

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

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

**The year of presentation:** 2024

### **Abstract:**

In this master thesis I dealt with the analysis and characterization of selected polymorphic microsatellites found in the Black stork (*Ciconia nigra*).

In the theoretical part I described the phylogenetic relationships within the genus *Ciconia*, characterized the Black stork including its nesting, migration, distribution, reproduction, foraging behavior, karyotype and mitochondrial genome. Other chapters dealt with microsatellites, *de novo* isolated microsatellites for the species of the family Ciconiidae and from order Procellariiformes used in the cross-species PCR amplification.

In the experimental part, using cross-species PCR amplification and population and genetic softwares I characterized the microsatellites that were polymorphic in this species in my bachelor thesis (Musilova, 2022) on the genomic DNA of 24 unrelated Black stork's individuals. A total of 15 loci were polymorphic with 2 to 6 alleles. I genotyped these loci and described their population genetic properties. There was no linkage detected between the loci and one of them (Ole26) was linked to the Z sex chromosome. Then I tested 11 microsatellites isolated from the White stork for polymorphism in the Black stork and none of them were polymorphic.

**Keywords:** Black stork (*Ciconia nigra*), microsatellites, cross-species PCR amplification, Procellariiformes

**Number of pages:** 63

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citovaných literárních zdrojů pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D.

V Olomouci dne 26.4.2024

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, poskytnuté materiály, veškerou pomoc, ochotu, trpělivost a věnovaný čas při zpracovávání teoretické i experimentální části diplomové práce.



## 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	Čáp černý.....	3
3.1.1	Hnízdění a rozmnožování.....	4
3.1.2	Rozšíření a migrace.....	5
3.1.3	Projekt Africká odysea.....	5
3.1.4	Ohrožení a ochrana druhu.....	6
3.1.5	Genetické studie na čápovi černém.....	7
3.2	Repetitivní sekvence.....	9
3.3	Mikrosatelity.....	11
3.3.1	Klasifikace a výskyt mikrosatelitů.....	11
3.3.2	Mutační mechanismus.....	12
3.3.3	Hledání mikrosatelitů.....	12
3.3.4	Využití mikrosatelitů.....	13
3.3.5	<i>De novo</i> izolované mikrosatelity z čeledi čápovití a jejich využití.....	13
3.3.6	Mikrosatelity testované v řádu čápi.....	16
3.3.7	<i>Cross-species</i> amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí.....	18
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>20</b>
4.1	Biologický materiál.....	20
4.2	Použité chemikálie.....	20
4.3	Použité roztoky.....	21
4.4	Použité laboratorní přístroje.....	22
4.5	PCR amplifikace DNA čápa černého.....	23
4.6	Elektroforetická separace PCR produktů.....	25
4.7	Statistické zpracování experimentálních dat.....	27
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>43</b>

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1</b> Fylogenetické vztahy uvnitř rodu <i>Ciconia</i> dle Sheldon <i>et Slikas</i> (1997), Slikas (1997 a 1998) a Ghimire (2023).....	3
<b>Obrázek 2</b> Čáp černý ( <i>Ciconia nigra</i> ) v řece Desné na Šumpersku v Olomouckém kraji .....	4
<b>Obrázek 3</b> Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu 10 C5 .....	34
<b>Obrázek 4</b> Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Pacbel_19907 .....	34
<b>Obrázek 5</b> Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu 11F3. ....	34
<b>Obrázek 6</b> Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Ole26.....	34
<b>Obrázek 7</b> Procentuální zastoupení polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa černého vzhledem ke zdrojovému řádu nového systému (Prum <i>et al.</i> , 2015). ....	41

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b> Karyotyp čápa jabiru, jihoamerického, bílého a černého a nesýta amerického.....	8
<b>Tabulka 2</b> <i>Cross-species</i> PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u ptačích druhů kladu <i>Aequorlornithes</i> testovaných v Laboratoři populační genetiky KBB PřF UPOL.....	19
<b>Tabulka 3</b> Složení PCR reakční směsi pro 24 vzorků.....	23
<b>Tabulka 4</b> Testované mikrosatelitové lokusy z řádu trubkonosí, dlouhokřídlí a čápi. ....	24
<b>Tabulka 5</b> Charakteristika 15 polymorfních mikrosatelitových lokusů amplifikovaných na DNA 24 jedinců čápa černého.....	30
<b>Tabulka 6</b> Polymorfní mikrosatelitové lokusy testované na 24 nepřibuzných jedincích čápa černého.....	32
<b>Tabulka 7</b> Hodnoty P-value mezi vybranými dvojicemi mikrosatelitových lokusů testovaných v této diplomové práci a v diplomové práci Cahlíkové (2011) u čápa černého ve vazbě.....	33
<b>Tabulka 8</b> Polymorfní mikrosatelitové lokusy u čápa černého v této diplomové práci v porovnání s dalšími ptačími druhy kladu <i>Aequorlornithes</i> , u kterých byl v rámci Laboratoře populační genetiky KBB PřF UPOL testován jejich polymorfismus. ....	38

# 1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké úseky DNA složené z bezprostředně za sebou opakujících se repetit o délce 1–6 bp. Nacházejí se v eukaryotických i prokaryotických genomech. Jsou to vysoce variabilní a kodominantní molekulární markery používané zejména při nízkonákladových genetických studiích variability populací, příbuzenství, při fylogenetických analýzách nebo ve forenzní analýze DNA.

Čáp černý je velký brodivý pták převážně černé barvy hnízdící skrytě v lesích, často v chráněných územích. Ve střední Evropě byl v minulosti zaznamenán úbytek počtu čápů černých, v posledních letech se však jejich počet opět zvýšil. Do povědomí veřejnosti se také dostal díky projektu Africká odysea, v rámci kterého byli sledováni čápi černí při migraci do Afriky do svých zimovišť.

V této diplomové práci bych chtěla navázat na svou bakalářskou práci (Musilová, 2022), ve které jsem našla polymorfni lokusy z řádu trubkonosí u čápa černého. Chtěla bych provést jejich genotypizaci a charakteristiku na 24 nepříbuzných jedincích čápa černého a také otestovat polymorfismus 11 mikrosatelitových lokusů popsanych pro čápa bílého (Turjeman *et al.*, 2016).

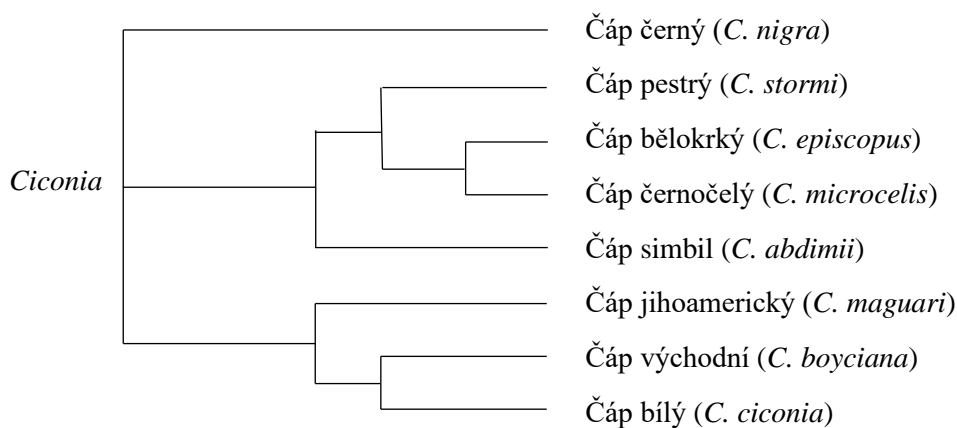
## 2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce: charakteristika testovaného druhu, mikrosatelity polymorfni u druhů rodu *Ciconia* s důrazem na čápa černého.
3. Amplifikace a charakteristika vybraných mikrosatelitových lokusů na DNA 23 nepříbuzných jedinců čápa černého; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfni v bakalářské práci autorky (Musilová, 2022) a mikrosatelitů popsaných pro čápa bílého v publikaci Feldman Turjeman *et al.* (2016).

### 3 Literární přehled

#### 3.1 Čáp černý

Čáp černý (*Ciconia nigra*) patří do řádu Ciconiiformes. V aktuálním pojetí tvoří tento řád jediná čeleď Ciconiidae, do které je řazeno celkem 20 druhů ptáků, rozdělených do šesti rodů (*Anastomus*, *Ciconia*, *Ephippiorhynchus*, *Jabiru*, *Leptoptilos* a *Mycteria*). Čáp černý spadá společně s čápem simbilem (*C. abdimii*), východním (*C. boyciana*), bílým (*C. ciconia*), bělokrkým (*C. episcopus*), jihoamerickým (*C. maguari*), černočelým (*C. microcelis*) a pestrým (*C. stormi*) do rodu *Ciconia*. Čáp černočelý byl dříve považován za poddruh čápa bělokrkého, ale v roce 2023 byl na základě genetických i morfologických odlišností a jeho alopatrického výskytu vyčleněn jako samostatný druh (Ghimire *et al.*, 2023). Na obrázku 1 jsou znázorněny fylogenetické vztahy uvnitř rodu *Ciconia* včetně nově zařazeného čápa černočelého.



**Obrázek 1** Fylogenetické vztahy uvnitř rodu *Ciconia* dle Sheldon *et Slikas* (1997), Slikas (1997 a 1998) a Ghimire (2023).

Podobně jako ostatní čápi je čáp černý velký brodivý pták s dlouhým krkem a dlouhým klínovitým zobákem, který má čáp černý stejně jako protáhlé brodivé nohy zbarvený do červena (Sackl, 2003). Jeho tělo v dospělosti dorůstá délky 95–100 cm a je až na oblast od hrudi po spodní ocasní krovky, která je bílá, kryto černým peřím s fialovým a zeleným leskem. Má krátký ocas. Jeho černá široká křídla dosahují rozpětí cca 1,5 m (Hutchins *et al.*, 2002). Samci dorůstají o trochu větších rozměrů, dospělci obou pohlaví jsou stejně zbarvení (Obrázek 2), opeření mláďat je hnědší a většinou bez lesku (Elliott *et al.*, 2020).



**Obrázek 2** Čáp černý (*Ciconia nigra*) v řece Desné na Šumpersku v Olomouckém kraji (Foto: Petr Černý, 2023).

### 3.1.1 Hnízdění a rozmnožování

Čáp černý pro své hnízdiště vyhledává řídkší jehličnaté i smíšené klidné lesy bez přítomnosti lidí, v blízkosti stojatých a mírně tekoucích vod, které jsou jeho častým zdrojem potravy (Hutchins *et al.*, 2002). Pro lov své kořisti i hnízdění si vybírá místa s čistou vodou a oblasti, které díky neporušené přírodě často spadají mezi chráněná území, proto je jeho výskyt možné použít jako bioindikátor životního prostředí a kvality stanoviště (Amat *et Green*, 2010). Potravu shání i mimo hnízdiště na okolních loukách a polích (Miltschev *et al.*, 2000). Při vyhledávání potravy je možné čápa černého zahlédnout v blízkosti lesních cest, ve vesnicích i na okrajích měst, většinou ve spojitosti s vodou, kde shání potravu, která je téměř výlučně živočišná, živí se převážně drobnými rybami, dále hmyzem, žábami, plazy, savci a ptáky (Hampl *et al.*, 2005). V České republice se jeho hnízda většinou nacházejí ukrytá v korunách stromů. Ve většině případů se nevyskytuje více hnízd v těsné blízkosti (Hampl, 2007). Na území jižní Afriky však byly zaznamenány populace hnízdící na útesech v nepřístupných oblastech v blízkosti supů a jiných druhů velkých ptáků (Tarboton, 1982). Někdy čáp osídlí i cizí ptačí hnízdo, např. orlí. Čáp černý žije v monogamii (Hutchins *et al.*, 2002). Samec se samicí stavějí své hnízdo společně, nejčastěji z větví, mechů, lišejníků a travin v korunách vysokých stromů nebo řídkěji ve skalách a obývají ho po více hnízdních sezón (Hora *et al.*, 2015). Jednotlivé páry čápů hnízdí samostatně a jednou ročně. K páření dochází krátce po přiletu na hnízdo během konce dubna a v květnu. Samice do hnízda snáší 3–5 vajec, hnízda rušená činností člověka vykazují méně početnou snůšku než hnízda v klidných oblastech. K vylíhnutí mláďat dochází po 32–38denním sezení na vejcích. Mláďata jsou závislá na potravě od rodičů, kterou jim nosí v hrdelním vaku, sexuální dospělosti

dosahují ve věku 3–5 let (Hutchins *et al.*, 2002). Volně v přírodě žijící čápi se dožívají věku až 18 let, v zajetí žijí déle, až 31 let (delHoyo *et al.*, 1992).

### 3.1.2 Rozšíření a migrace

Z čeledi Ciconiidae má čáp černý největší geografický areál výskytu. V období hnízdění se čáp černý vyskytuje napříč palearktickou oblastí od Španělska po Čínu. Na podzim jedinci migrují do jižní a subsaharské Afriky. V jižních oblastech Afriky od Malawi na jih po Mosambik, Jihoafrickou republiku a Lesotho a na západ do Namibie se vyskytuje samostatná izolovaná populace, která má pravděpodobně původ u přezimujících předků (Lee *et al.*, 2003; Mazloom, 2006).

### 3.1.3 Projekt Africká odyssea

Migraci čápa černého se zabýval projekt Africká odyssea, který probíhal během let 1995–2001 se značným mediálním zájmem a byl prezentován zejména v Českém rozhlase pod vedením Mgr. Miroslava Bobka. Na projektu se z velké části podílel Mgr. Radek Hampl, Ph.D., který tou dobou působil na Katedře zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a výstupy z tohoto projektu zahrnul do své disertační práce (Hampl, 2008). Hlavním cílem projektu Africká odyssea bylo sledování migrace, chování a ekologie čápů černých a byla poprvé odborně popsána cesta čápů černých z místa hnízdění do jejich zimovišť. Bobek *et al.* (2007) ve své studii umožnili srovnání dvou hlavních migračních směrů čápů hnízdících na stejném území a poprvé potvrdili věrnost používání jedné tahové cesty po několik let. Celkem 18 čápů černých z 11 hnízd ve středních Čechách bylo vybaveno miniaturními satelitními vysílači, v některých případech byly monitorovány celé čapí rodiny a 3 jedinci byli sledováni po více let. Některá mláďata ztratila vysílač a nemohla být dále monitorována. Použitím satelitní telemetrie bylo možné sledovat čápy na velké vzdálenosti, pomocí konvenční radiotelemetrie byla sledována jejich hnízdiště, zastávky během migrace a zimoviště. Čápi zahájili podzimní migraci na přelomu srpna a září, nebyly zaznamenány významné rozdíly mezi jedinci odlišného pohlaví ve volbě trasy, dne odletu ani délky letu. Čápi využili dvě různé migrační trasy do zimoviště. Čápi migrovali právě těmito trasami kvůli jejich způsobu letu, při kterém využívají stoupavé proudy vzduchu, které vznikají pouze nad pevninou. Tři samci, 3 samice a 2 mláďata letěli západní cestou přes Německo, Francii a Španělsko, v blízkosti Gibraltaru přeletěli přes Středozevní moře a pokračovali do západní Afriky, kde zimovali ve východním Senegalů v povodí řeky Falémé, v Guinei, jižní Mauretánii, Pobřeží slonoviny, Sierra Leone, západní a střední části Mali. Východní cestou přes Balkán, Turecko a Izrael migrovali do Afriky tři samci a dvě samice. Zimovali v severní Etiopii, střední části Středoafričské republiky v povodí řeky Kotto, v Čadu a v severovýchodní Nigérii. Průměrná celková migrační vzdálenost sledovaných čápů byla více než 6 000 km, migrace západní cestou trvala průměrně pět týdnů a čápi během ní trávili méně



času na odpočinkových místech, východní cesta byla výrazně delší a migrace trvala téměř tři měsíce. Během migrace byli čápi pozorováni ve vnitrozemí v kopcích i v horách. Opakovaně sledovaní jedinci migrovali každý rok převážně po stejné trase a zimovali ve stejném zimovišti, trasy se lišily pouze v detailech. Mláďata většinou migrovala se svými rodiči nebo sourozenci. Na rozdíl od čápů bílých, kteří jsou při migraci velmi společenší, migrovali čápi černí samostatně nebo v malých skupinách (Bobek *et al.*, 2008).

### 3.1.4 Ohrožení a ochrana druhu

Organizace Wetlands International odhaduje celosvětovou populaci čápa černého na 24 000–44 000 jedinců. Globální stav ohrožení druhu podle červeného seznamu IUCN je Least-concern, což značí velmi malé nebo žádné obavy z jeho vyhynutí. Některé regionální populace rostou, jiné klesají nebo jsou stabilní (Elliott *et al.*, 2020).

Na počátku 20. století došlo k jeho trvalému vymizení v Dánsku a ve Švédsku, ve střední Evropě došlo pouze k poklesu početnosti populace čápa černého (Elliott *et al.*, 2020), ve 30. letech 20. století začal znovu osídlovat původní území střední Evropy a došlo opět k nárůstu populace (Hora *et al.*, 2015). V roce 2011 hnízdilo v Evropě 7 800–12 000 párů, což představovalo více než polovinu jejich tehdejší světové populace (Anonymous, 2011). V České republice hnízdili čápi černí do konce 19. století jen na jižní Moravě, od druhé poloviny 20. století začala nová expanze a jejich hnízdění bylo prokázáno v severovýchodních Čechách u Trutnova a v Orlických horách, v Lánské oboře cca 50 km západně od Prahy a na jihu Čech v Novohradských horách, v následujících dvou desetiletích postupně osídlili vhodné lokality na území celé České republiky (Hudec *et Šťastný*, 2006). Při sčítání čápů v roce 1994 hnízdilo v České republice kolem 300 párů čápů, v roce 2004 při druhém celostátním sčítání 300–400 hnízdících párů (Pojer, 2009) a při třetím celostátním sčítání v roce 2014 byl odhad populace asi 500 hnízdících párů (Sychrová, 2024). Přestože se stavy čápa černého zvyšují nebo alespoň neklesají, je dle České ornitologické společnosti čáp černý označen jako silně ohrožený a chráněný druh.

V posledních desetiletích byl zaznamenán úbytek populace čápa černého v Jihoafrické republice, Lesothu a Svazijsku. Ze všech druhů čápů žijících v těchto oblastech vykazoval čáp černý největší pokles (Smith *et al.*, 2017). Na rozdíl od evropských a asijských migračních populací je na jihu Afriky čáp černý označován jako rezidentní a zranitelný (Lee *et al.*, 2023). Úbytek populace čápa černého stejně jako jiných velkých suchozemských ptáků žijících na africkém kontinentu pravděpodobně způsobily rozsáhlé změny životního prostředí jako je degradace původně nedotčených přírodních stanovišť, přístupnost hnízdišť lidem, dezertifikace, znečištění a kumulace pesticidů (Chevallier *et al.*, 2010). Od druhé poloviny 20. století byl regionální stav čápů černých žijících na jihu Afriky několikrát prověřován (Siegfried, 1967; Tarboton, 1982 a Taylor, 2015). Vzhledem k tomu, že početnost populace čápa černého vykazuje značné rozdíly mezi severní polokoulí a rezidentní populací na jižní polokouli, byl stav jihoafrické

populace znovu přezkoumán. V letech 2017–2021 byla znovu navštívena dříve sledovaná hnízdiště. Pomocí záznamů výskytu jedinců čápa černého z mobilní aplikace Bird Lasser a za použití informací z databáze Southern African Bird Atlas Project byly vytvořeny prediktivní modely pro vhodné biotopy a oblasti, kde čápi shánějí potravu a rozmnožují se. Zejména v rozsáhlém přírodním útočišti Krugerova národního parku, nacházejícího se v Jihoafrické republice u hranic s Mozambikem, byla zaznamenána velká část nehnízdící populace, která se v období páření nachází mimo oblast hnízdišť, neztrácí tak velké množství dospělých jedinců, ale v důsledku absence páření některých z nich, nedochází k líhnutí dostatečného počtu mláďat. Ze 17 historicky sledovaných hnízd byly nalezeny důkazy o hnízdění jen u 2 z nich, některá původní hnízda byla již po několik let opuštěná. Odhad populace čápa černého na jihu Afriky v porovnání s předchozími studii zjistil za poslední tři desetiletí pokles z původních cca 950 na 600 jedinců (Lee *et al.*, 2023).

### 3.1.5 Genetické studie na čápovi černém

V posledních letech byly prováděny genetické studie některých druhů zástupců čeledi Ciconiidae, čáp černý však nebyl předmětem výzkumu mnoha z nich. U některých zástupců řádu Ciconiiformes jsou známy jejich karyotypy většinou studované konvenčním barvením chromozomů, jejichž počtem se jednotlivé druhy tohoto řádu značně liší a počet chromozomů nabývá hodnot  $2n = 52–78$ . V karyotypech převažují mikrochromozomy, jejichž fúzí dochází často ke vzniku dvouramenných chromozomů a poklesu počtu diploidních chromozomů (Seligmann *et al.*, 2019). Karyotyp čápa černého byl sestaven koncem 20. století. Počet chromozomů čápa černého je  $2n = 52$  včetně 10 párů dvouramenných chromozomů, z nichž 9 párů jsou autozomy a 1 pár pohlavní chromozomy (Belterman *et Boer*, 1990), detailní popis jeho karyotypu však není znám. Nejnovější studie se zabývají detailní charakteristikou karyotypu a distribucí konstitutivního heterochromatinu čápa bílého s počtem chromozomů  $2n = 68$  (Abu Shnaf *et Al-Khalífa*, 2021) a čápa jihoamerického s počtem chromozomů  $2n = 72$  (Seligmann *et al.*, 2019). Ze všech druhů, pro něž jsou známy karyotypy, má čáp černý nejnižší počet chromozomů, naopak marabu indomalajský (*Leptoptilos javanicus*) má počet chromozomů nejvyšší ( $2n = 78$ ). V Tabulce 1 uvádím jako příklad karyologicky prostudované 2 druhy zástupců rodu *Ciconia*: čápa jihoamerického (Seligmann *et al.*, 2019) a bílého (Abu Shnaf *et Al-Khalífa*, 2021) společně s dostupnými informacemi o karyotypu čápa černého, náležejících do tribu Ciconiini a pro srovnání uvádím informace o karyotypu čápa jabiru z tribu Leptoptilini (Seligmann *et al.*, 2019) a nesyta amerického z tribu Mycteriini (Francisco *et Galetti*, 2000).

**Tabulka 1** Karyotyp čápa jabiru, jihoamerického, bílého a černého a nesyta amerického. Dle dostupných informací o karyotypu je pro jednotlivé druhy uveden celkový počet chromozomů (2n), počet párů makrochromozomů a rozdělení jednotlivých makrochromozomů na meta-, sub-, akro-, subtelo- a telocentrické a jejich počty (N) (Seligmann *et al.*, 2019; Francisco *et Galetti*, 2000; Abu Shnaf *et Al-Khalifa*, 2021).

Karyotyp	Druh									
	Čáp jabiru ( <i>J. mycteria</i> )		Čáp jihoamerický ( <i>C. maguari</i> )		Čáp bílý ( <i>C. ciconia</i> )		Čáp černý ( <i>C. nigra</i> )		Nesyt americký ( <i>M. americana</i> )	
Počet chromozomů 2n	56		72		68		52		72	
Páry makrochromozomů	11 autozomálních Z,W		11 autozomálních Z,W		10 autozomálních Z,W		9 Z,W		10 Z,W	
	N	Číslo chromozomu	N	Číslo chromozomu	N	Číslo chromozomu	N	Číslo chromozomu	N	Číslo chromozomu
Metacentrické	6	1,4,6–8 a 10	2	7,8	4	6–8,10		neuveďeno	8	1,2,4–8,10
Submetacentrické	3	2 a 5 Z	8	1,2,4–6,10 Z,W	5	1,2,4,5 Z		neuveďeno	1	Z
Akrocentrické	2	3 a 6 W	2	3,9	1	9 W		neuveďeno		neuveďeno
Subtelocentrické		neuveďeno		neuveďeno	1	3		neuveďeno	1	3
Telocentrické	1	11	1	11		neuveďeno		neuveďeno	2	9 W

Samci čápů jsou stejně jako samci ostatních neognátních ptáků homogametického pohlaví, jejich chromozomová sada obsahuje kombinaci pohlavních chromozomů ZZ a samice jsou heterogametického pohlaví kombinace ZW (Stevens, 1997). Chromozom Z patří u většiny ptačích druhů k největším chromozomům a obsahuje téměř všechny známé geny vázané na pohlaví. Naopak chromozom W je menší s vysokým podílem repetitivních sekvencí, v některých vlastnostech, například v morfologii a rozmístění genů je podobný savčímu chromozomu Y, je genově chudý a převážně tvořen heterochromatinem. Pohlavní chromozomy Z a W vykazují rekombinaci přísně lokalizovanou ve velmi krátké pseudoautozomální oblasti (Pigozzi *et al.*, 2005). Předpokládá se, že diferenciace těchto pohlavních chromozomů u moderních ptáků souvisí s postupným ukončováním meiotické rekombinace (Handley *et al.* 2004; Schmid *et al.* 2005). Chromozom Z čápa černého byl použit pro komparativní cytogenetické analýzy mezi ptačími druhy různých řádů. Byl pozorován jako největší z 5 středně velkých párů submetacentrických chromozomů v karyotypu čápa černého. Na chromozom Z čápa černého byly mapovány klony z knihoven bakteriálních umělých chromozomů (BAC) obsahující geny kondora kalifornského a vzniklé mapy byly porovnávány s ostatními ptačími druhy. Uspořádání genů kondora a čápa černého na chromozomu Z bylo ve srovnání s ostatními testovanými druhy kolineární, vyskytovaly se však některé odlišnosti způsobené řadou inverzí a transpozic (Modi *et al.*, 2009).

S rozvojem sekvenační metody shotgun *genom-skimming* na platformě Illumina byl sekvenován kompletní mitochondriální genom čápa černého. Mitochondriální genom tvoří kruhová dvouvláknová DNA, dlouhá 17 787 bp, sestává ze 13 genů kódujících proteiny, 22 tRNA, 2 rRNA a jedné nekódující kontrolní oblasti D-smyčky (Liang *et al.*, 2019). Dříve byl již sekvenován mitochondriální genom čápa východního (*C. boyciana*) rovněž o velikosti téměř 18 kbp (Yamamoto *et al.*, 2000). Studium mitochondriálního genomu bylo využito ve fylogenetické analýze a podpořilo monofylii rodu *Ciconia* (Liang *et al.*, 2019). Mitochondriální genom těchto čápů je velikostně podobný například lidskému mitochondriálnímu genomu, který tvoří též kruhová molekula dsDNA o délce 16 569 bp (Habbane *et al.*, 2021).

### 3.2 Repetitivní sekvence

Repetitivní sekvence se nacházejí masivně v eukaryotických a méně v prokaryotických genomech. Zejména genom eukaryot je z velké části tvořen repetitivními sekvencemi, které jsou příčinou jeho značné velikosti, která je až tisícinásobná oproti genomu prokaryot, který je tvořen převážně sekvencemi kódujícími geny a nekódující DNA zabírá jen jeho velmi malou část (Saitou, 2013). Repetitivní sekvence v genomu hrají nepostradatelnou roli v evoluci a variabilitě organismů, dále v jejich genové expresi a regulaci exprese, například transkripce (Liao *et al.*, 2021). Lze je rozdělit na tandemové a rozptýlené.

Největší z tandemových repetitivních sekvencí jsou nazývány makrosatelity a každá makrosatelitní repetice má délku několika kbp (Trent *et al.*, 2012). Snížený počet těchto repetitivních sekvencí například na

lidském chromozomu 4 je příčinou snížené methylace, selhání epigenetické represe a rozvoje genetického onemocnění facioskapulohumerální svalové dystrofie (FSHD) (Fecek *et Emmady*, 2023). Opakující se jednotky o velikosti 10–100 bp se označují jako minisatelity, typicky se opakují 5–50×, vyznačují se velkým počtem mutací a vysokou diverzitou v populaci (Raj *et Das*, 2021). Malé tandemové repetice o velikosti 2–6 bp (Trent *et al.*, 2012), podle některých zdrojů 2–9 bp, jsou označovány jako mikrosatelity (Vieira *et al.*, 2016).

Rozptýlené repetice jsou náhodně roztroušené v genomu a převládají. Většinu těchto rozptýlených repetic lze označit jako transponovatelné prvky, tedy sekvence, které se pohybují z jedné části genomu do jiné. Hojně zastoupené v eukaryotickém genomu jsou retrotranspozony využívající k přemístění proces retrotranspozice (Shammas, 2013). LTR-retrotranspozony jsou transpozony strukturálně podobné retrovirům, jejichž centrální oblast, kódující mimo jiné strukturní proteiny a proteiny s funkcí reverzní transkriptázy a integrázy, je ohraničena několik set bp dlouhými terminálními repeticemi (LTR) orientovanými stejným směrem, bezprostředně vedle LTR se nacházejí krátké obrácené repetice (Shammas, 2013). Transpozice probíhá prostřednictvím reverzní transkripce RNA, nejprve dochází k syntéze RNA z DNA retrotransponu, v cytoplazmě dochází ke zformování viru podobné částice, ve které je pomocí reverzní transkriptázy tato RNA použita jako templát pro syntézu dsDNA. Nově syntetizovaná DNA je poté transportována do jádra a začleněna do některého místa na chromozomu za vzniku nové kopie transponu (Havecker *et al.*, 2004). Další skupinu tvoří retrotranspozony bez dlouhých terminálních repetic přemísťující se prostřednictvím molekuly RNA, která se do DNA přepisuje reverzní transkripcí za využití proteinů, které tyto elementy samy kódují, při začlenění do cílového místa vytvářejí duplikace. Jsou zde řazeny například dlouhé rozptýlené jaderné elementy LINE, které jsou autonomní a od nich odvozené neautonomní krátké rozptýlené jaderné elementy SINE (Trent, 2012). Tvoří značnou část lidského genomu, ale aby se organismus mohl normálně vyvíjet a fungovat, musejí být blokovány například procesem RNA-interference. Dalším typem jsou DNA-transpozony, jejichž transpozice probíhá mechanismem *cut and paste*, vyčleňují se z jedné pozice v genomu a začleňují se do jiné za pomoci enzymu transpozázy, většinou kódovaného samotným transpozonem. Nejjednodušším z nich jsou IS elementy typické pro bakterie. Obsahují pouze geny, jejichž produkty slouží k transpozici nebo její regulaci a na koncích jsou ohraničeny krátkými identickými vzájemně obráceně orientovanými sekvencemi. Enzym transpozáza se váže ke koncům elementu, kde štěpí oba řetězce DNA, vyčlení element z chromozomu nebo plazmidu a následně jej začlení do nového místa stejné nebo jiné molekuly DNA, přičemž v místě začlenění dochází na obou stranách elementu k duplikaci části sekvence cílové DNA. Začleněním dvou IS elementů blízko sebe může dojít ke vzniku složeného transponu a přemístění původně nepohyblivé oblasti mezi dvěma elementy. Příkladem replikativních transponů jsou Tn3 elementy, které využívají rozšířený přenos pomocí vzniku tzv. kointegrátu fúzí dvou kružnicových molekul za pomoci enzymu transpozázy. Během tohoto

procesu dochází k replikaci elementu, místně specifické rekombinaci mezi kopiemi a následnému rozložení kointegrátu na dva plazmidy, kdy každý nese kopii elementu (Hickman *et al.*, 2010; Snustad *et Simmons*, 2017). Mezi eukaryotické DNA transpozony patří helitrony přemísťující se mechanismem otáčející se kružnice a polintony, které se pravděpodobně replikují pomocí DNA polymerázy, kterou si samy kódují (Feschotte *et Pritham*, 2007).

### 3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity, jinak nazývané jednoduché repetitivní sekvence (SSR) nebo krátké tandemové repetice (STR), se označují krátké segmenty DNA o délce 1–6 párů bazí, které se v určitém genomovém místě několikrát za sebou opakují. Uvedený počet párů bazí se však v různých zdrojích literatury liší, někteří autoři uvádějí délku segmentu 1–9 bp (Vieira *et al.*, 2016). Celková délka úseku vzniklého opakováním těchto jednotek činí 10–100 bp (Kantartzi, 2013). Tyto sekvence DNA jsou zpravidla nekódující. Počet opakujících se jednotek v mikrosatelitní sekvenci a kombinace vzorů bývá charakteristická pro každého jedince, což mikrosatelity činí užitečnými jako polymorfní markery (Morris, 2024).

#### 3.3.1 Klasifikace a výskyt mikrosatelitů

Mikrosatelity je možné klasifikovat dle několika kritérií. Jednoduché mikrosatelity se skládají z jedné repetice (např. CGCGCGCGCGCGCG), složené ze dvou respektive více repetic (např. CGCGCGCGGTATATATATA). Dokonalé mikrosatelity nemají sekvenci přerušenu žádnou bazí, jako nedokonalé se označují mikrosatelity, do nichž je vložena 1 a více bazí, které přerušují jejich základní sekvenci (např. ATGATGATGCATGATG) (Oliveira *et al.*, 2006).

Mikrosatelity se hojně vyskytují u eukaryot, lze je nalézt i u prokaryot. Jsou široce rozšířené napříč genomem, zejména v euchromatinu eukaryot, v jaderné DNA i DNA jiných organel (Vieira *et al.*, 2016). Jsou zastoupeny v nekódujících částech genomu jako jsou introny, netranslatované oblasti (UTR) a intergenové oblasti, ale také v kódujících exonových sekvencích, mohou být i součástí transpozonů a jiných rozptýlených repetic (Vieira *et al.*, 2016). V genových oblastech byl zaznamenán nižší výskyt mikrosatelitů z důvodu jejich vysoké míry mutací, které by mohly narušit genovou expresi. V kódujících oblastech pravděpodobně v důsledku působení selekčního tlaku proti mutacím měnícím čtecí rámec převládají tri- a hexanukleotidové repetice. Pokud dojde ke zmnožení těchto tripletových repetic, může dojít ke vzniku některých chorob. Příkladem těchto genetických neurologických onemocnění je syndrom fragilního X nebo Huntingtonova choroba (Zhang *et al.*, 2004; Brouwer *et al.*, 2009). Živočišné genomy hojně obsahují GA dinukleotidové repetice, zatímco u rostlin je frekvence jejich výskytu nízká. GC dinukleotidové repetice se v kódujících sekvencích nacházejí méně často, než trinukleotidové

repetice obsahující GC, zatímco trinukleotidové repetice bohaté na AT jsou rozptýleny rovnoměrně ve všech genomových oblastech (Abdurakhmonov, 2016).

### 3.3.2 Mutační mechanismus

Kvůli vysoké míře mutací jsou mikrosatelity velmi variabilní. Uvádí se, že mutují rychlostí  $10^{-3}$ – $10^{-6}$  na buněčnou generaci, což je o 10 řádů větší rychlost než u bodových mutací (Gemayel *et al.*, 2012). Za hlavní mechanismus vzniku těchto vysokých četností mutací je považováno sklouznutí řetězce DNA polymerázy během replikace DNA (DNA *slippage*), při kterém dochází ke vzájemnému oddělení řetězců DNA a opětovnému spojení v jiné poloze, což vede k chybnému párování komplementárních bazí a syntéze odlišného počtu repetic. V rámci reparace dochází k vytvoření smyčky. Dochází-li ke tvorbě smyčky v nově vznikajícím řetězci dochází ke vzniku repetic a je-li smyčka vytvořena v templátu, dochází ke ztrátě repetic. Rozdílný počet opakujících se jednotek, které byly v důsledku skluzu DNA polymerázy přidány nebo naopak odstraněny, je příčinou vzniku polymorfismu a nových alel (Vieira *et al.*, 2016). Dle některých autorů pravděpodobnost skluzu polymerázy závisí na délce mikrosatelitu a alely s vysokým počtem repetic jsou méně stabilní s vyšší frekvencí mutací než alely s nižším počtem repetic (Dieringer *et Schlötterer*, 2003). Mutace mohou vznikat i během rekombinace v průběhu meiózy, nové repetice mohou generovat inserce, delece nebo substituce jednoho nukleotidu, na vzniku se mohou podílet i transpozony (Nadir *et al.*, 1996). Řada chyb může být v jádře opravena kontrolními mechanismy, některé chyby však unikají opravě a způsobují vznik nových alel na mikrosatelitových lokusech.

### 3.3.3 Hledání mikrosatelitů

Existuje několik způsobů hledání mikrosatelitů. Prvním z nich je izolace mikrosatelitů *de novo*. Nejprve je třeba zkonstruovat genomovou knihovnu obohacenou o repetitivní sekvence selektivní hybridizací, PCR amplifikací nebo použitím biotinizovaných sond. Pro konstrukci knihovny a sekvenování je DNA fragmentována, ligována do adapterů a vložena do vektoru, kterým je transformována *Escherichia coli* (Senan *et al.*, 2014). S rozvojem sekvenačních metod nové generace je dále používána metoda *in silico* vycházející z DNA databází, ve kterých jsou specializovanými bioinformatickými programy vyhledávány mikrosatelitové sekvence o požadovaných vlastnostech. Na základě zjištěných nukleotidových sekvencí, mohou být v obou případech navrženy oligonukleotidy komplementární k oblastem lemujícím mikrosatelit, které jsou následně validovány pomocí PCR reakce a elektroforetické separace produktu, poté jsou hledány polymorfismy odlišující jednotlivé jedince (Vieira *et al.*, 2016). Vzhledem k tomu, že izolace a charakterizace mikrosatelitních markerů pro každý jednotlivý druh je časově i ekonomicky náročná, je možné použít metodu *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů využívající primery navržené pro jiný (obvykle příbuzný) zdrojový druh (Senan *et al.*, 2014).

Tento mezidruhový amplifikační přístup bývá považován za nejúčinnější alternativu k *de novo* vývoji mikrosatelitů (Maduna *et al.*, 2014). Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace negativně koreluje s evoluční vzdáleností mezi zdrojovým a cílovým zkoumaným druhem a je nepřímo úměrná evoluční vzdálenosti mezi dvěma druhy (Primmer *et al.*, 1996; Steinkellner *et al.*, 1997; Barbara *et al.*, 2007).

### 3.3.4 Využití mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou vysoce informativní, kodominantní a multialelové genetické markery podléhající mendelovské dědičnosti a jsou přenositelné mezi příbuznými druhy (Mason, 2015). Jejich PCR amplifikace je snadno automatizovatelná a lze ji provést i z malého množství DNA o nízké kvalitě. Umožňuje detekovat polymorfismus jako variaci v počtu repetice a odlišit tak i blízce příbuzné jedince (Abdurachmonov, 2016). Tyto markery jsou velmi užitečné při studiu struktury populace a její diverzity, měření genetické vzdálenosti, odhadu toku genů, v evolučních studiích vnitrodruhových vztahů, v analýze rodokmenů a genetickém mapování (Kumar, 2020). Nacházejí uplatnění ve forenzní genetice pro účely identifikace, určování příbuznosti a paternity nebo jako markery pro lokalizaci mutací u některých genetických poruch a onemocnění, například u výskytu kolorektálního karcinomu (Holmes, 1994; Lo *et al.*, 2024). V současné době s rozvojem NGS metod je pro primární vědecké studie a laboratoře s neomezenými financemi příklon ke studiu jednonukleotidových polymorfismů (SNP), jež jsou vysoce zastoupeny v genomu a jsou převládajícími typy používaných molekulárních markerů (Yirgu *et al.*, 2023). Pro laboratoře s omezenými finančními zdroji však znamená využití mikrosatelitů stále levnou, spolehlivou a robustní metodu.

### 3.3.5 *De novo* izolované mikrosatelity z čeledi čápoovití a jejich využití

V minulosti bylo provedeno 5 genetických studií, jejichž náplní byla *de novo* izolace, popis a charakterizace polymorfních mikrosatelitových lokusů od 3 druhů čeledi čápoovití, součástí studií byl návrh primerů. Polymorfní mikrosatelitové lokusy byly popsány pro nesyta amerického (*Mycteria americana*), čápa bílého (*C. ciconia*) a východního (*C. boyciana*). Celkem 15 polymorfních mikrosatelitových lokusů bylo charakterizováno u nesyta amerického (Van Den Bussche *et al.*, 1999; Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003), 18 polymorfních lokusů bylo popsáno pro čápa bílého (Shephard *et al.*, 2009; Turjeman *et al.*, 2016) a 8 polymorfních lokusů pro čápa východního (Wang *et al.*, 2011). U čápa černého nebyly doposud *de novo* izolovány žádné polymorfní mikrosatelitové lokusy. Níže jsou uvedeny studie popisující objevy polymorfních mikrosatelitových lokusů u nesyta amerického, čápa bílého a východního. Některé popsané lokusy byly využívány v dalších genetických analýzách variability a struktury populací daného druhu nebo byly použity pro *cross-species* PCR amplifikace jiných ptačích druhů.



Van Den Bussche *et al.* (1999) popsali 4 polymorfní mikrosatelitové lokusy pro nesyta amerického. DNA byla izolovaná ze vzorků krve 136 mláďat nesyta amerického pocházejících z devíti kolonií v Georgii a na Floridě. Sestavili genomickou knihovnu z inzertů o velikosti 200–400 bp a jejím screeninem identifikovali fragmenty obsahující mikrosatelitové lokusy, které následně izolovali, sekvenovali a navrhli primery komplementární k sekvencím ohraničujícím mikrosatelitové lokusy. Z celkového počtu 10 identifikovaných a osekvenovaných mikrosatelitových lokusů, byly 4 použity pro další genetické analýzy: WS1, WS2, WS4 a WS6. Počet detekovaných alel byl 2–4 na lokus,

Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) izolovali 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů pro nesyta amerického: WS $\mu$ 03, WS $\mu$ 08, WS $\mu$ 09, WS $\mu$ 13, WS $\mu$ 14, WS $\mu$ 17, WS $\mu$ 18, WS $\mu$ 19, WS $\mu$ 20, WS $\mu$ 23 a WS $\mu$ 24. DNA byla izolovaná z krve 11 jedinců nesyťů z populace žijící v Brazílii a 20 jedinců z populace žijící na Floridě. Celkem bylo testováno 24 párů primerů, 11 z nich amplifikovalo polymorfní lokusy a byly použity pro genotypizaci těchto 31 jedinců. Počet detekovaných alel byl v rozmezí 2–4 na lokus. Očekávaná heterozygotnost byla v rozmezí 0,091–0,697 a pozorovaná heterozygotnost 0–0,727. Stejně jako u předchozí studie (Van Den Bussche *et al.*, 1999) byla zaznamenána nízká variabilita a počet detekovaných alel na lokus.

Llanes-Quevedo *et al.* (2018) využili 5 nejpolymorfnějších mikrosatelitových lokusů: WS $\mu$ 03, WS $\mu$ 08, WS $\mu$ 09, WS $\mu$ 14 a WS $\mu$ 20 popsáných Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) ke studiu genetické variability nesyta amerického na ostrově Kuba. Na ostrově se nacházely pouze dvě reprodukčně aktivní kolonie a od 37 jedinců byly odebrány krevní vzorky, ze kterých byla následně izolovaná DNA. Všechny testované lokusy byly polymorfní, ale byl detekován nízký počet alel v rozmezí 2–3 na lokus. S výjimkou lokusu WS $\mu$ 08 nebyla zaznamenána žádná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Pozorovaná heterozygotnost vykazovala nejnížší hodnotu 0,25 pro lokus WS $\mu$ 20 a naopak nejvyšší hodnotu 0,48 pro lokus WS $\mu$ 03.

Devět mikrosatelitových lokusů: WS $\mu$ 03, WS $\mu$ 08, WS $\mu$ 09, WS $\mu$ 13, WS $\mu$ 17, WS $\mu$ 18, WS $\mu$ 20, WS $\mu$ 23 a WS $\mu$ 24, popsáných Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) pro nesyta amerického, bylo v práci Sharma *et al.* (2017) použito pro *cross-species* PCR amplifikaci u nesyta indomalajského. DNA byla extrahovaná ze 145 krevních vzorků jedinců žijících v areálu Národního zoologického parku v Dillí během tří hnízdních sezón. Z devíti testovaných lokusů, poskytlo pouze pět: WS $\mu$ 09, WS $\mu$ 13, WS $\mu$ 17, WS $\mu$ 18 a WS $\mu$ 23 polymorfní produkt se 2–5 detekovanými alelami na lokus. Očekávaná a pozorovaná heterozygotnost byla 0,206–0,702 a 0,233–0,735.

Shephard *et al.* (2009) popsali 7 mikrosatelitních markerů pro čápa bílého: Cc01–07 a současně testovali 6 párů *cross-species* primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů nesyta amerického: WS $\mu$ 03, WS $\mu$ 14, WS $\mu$ 17, WS $\mu$ 18, WS $\mu$ 20 a WS $\mu$ 23. Testovaná DNA byla odebrána od 30 jedinců čápů bílých z polodivoké populace ze zoologické zahrady v Belgii. U celkem 13 polymorfních lokusů bylo detekováno 2–10 alel na lokus. Očekávaná

heterozygotnost se pohybovala v rozmezí 0,13–0,84 a pozorovaná heterozygotnost v rozmezí 0,13–0,87. Lokus WS $\mu$ 03 vykazoval významnou odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Turjeman *et al.* (2016) charakterizovali novou sadu polymorfních mikrosatelitových markerů pro čápa bílého. Za využití sekvenčních metod nové generace našli celkem 100 mikrosatelitových lokusů, které dále testovali na polymorfismus. Testovaná DNA byla izolovaná z krve dvou jedinců čápa bílého pocházejících z volně žijících populací na severu Izraele a v severovýchodním Německu. Vybrali 64 lokusů o velikosti 100–350 párů bazí s dostatečným počtem tetranukleotidových repetic a otestovali je na amplifikaci a polymorfismus za použití PCR s fluorescenčně značenými primery na 94 vzorcích čápa bílého. Byla provedena genotypizace a z celkového počtu 64 testovaných lokusů bylo na základě konzistence amplifikace a počtu alel detekovaných na lokus vybráno 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů: Cc10, Cc15, Cc18, Cc37, Cc42, Cc44, Cc50, Cc58, Cc61, Cc69 a Cc72. Po úpravě podmínek PCR amplifikace těchto lokusů byly využity pro genotypizaci 213 jedinců čápa bílého, kteří pocházeli z východního Řecka a severovýchodního Německa. Počet detekovaných alel byl v rozmezí 2–10 na lokus s průměrnou hodnotou 5,3. Pozorovaná heterozygotnost byla v rozmezí 0,118–0,784 o průměru 0,519 a očekávaná heterozygotnost v rozmezí 0,136–0,827 s průměrem 0,565. Při párových testech vzorků z obou populací dohromady se lokus Cc50 a Cc58 odchyloval od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, při testování populací samostatně vykazoval odchylku pouze vzorek pocházející ze severovýchodního Německa. Nebyla prokázána žádná vazebná nerovnováha. Oproti dříve charakterizovaným mikrosatelitním markerům pro čápa bílého (Shephard *et al.*, 2009) vykazovala tato sada vyšší polymorfismus a heterozygotnost.

Wang *et al.* (2011) charakterizovali polymorfní mikrosatelitové lokusy u čápa východního. Z celkového počtu 11 testovaných párů primerů bylo 8 navrženo dle protokolu FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats) pro čápa východního: Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168, Cbo235 a 3 pocházely od nesyta amerického: WS $\mu$ 13, WS $\mu$ 17 a WS $\mu$ 18 a byly použity pro *cross-species* PCR amplifikaci. DNA byla izolovaná ze vzorků krve a jiných tkání 23 jedinců čápa východního. Bylo navrženo 14 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů, 11 z nich vykazovalo konzistentní amplifikaci a bylo použito pro další analýzu. Z vybraných lokusů bylo 10 polymorfních, jelikož u jednoho lokusu sice byly detekovány 2 alely, ale všech 23 jedinců pro tento lokus vykazovalo homozygotní genotyp. Počet detekovaných alel se pohyboval v rozmezí 2–8, pozorovaná heterozygotnost byla v rozmezí 0–0,857 a očekávaná heterozygotnost v rozmezí 0,222–0,851. Vysoký podíl homozygotů značil na lokusech Cbo133 a Cbo235 možný výskyt nulových alel. Nebyla prokázána žádná vazebná nerovnováha.

Kaminsin *et al.* (2023) využili celkem 14 polymorfních mikrosatelitových lokusů popsanych pro čápa bílého: Cc05, Cc06, Cc07, Cc10, Cc42, Cc50, Cc58 a Cc72 (Shephard *et al.*, 2009; Turjeman *et al.*, 2016) a východního: Cbo108, Cbo109, Cbo133, Cbo151, Cbo168

a Cbo235 (Wang *et al.*, 2011) pro genotypizaci 114 jedinců nesytů žijících v Zoologické zahradě Dusit v Thajsku. Cílem výzkumu bylo rozlišit a identifikovat hybridy pocházející ze dvou rodičovských druhů: nesyta bílého a indomalajského, jelikož oba druhy nesytů žijící v této populaci vykazovali vysokou fenotypovou podobnost. Pro usnadnění automatické genotypizace byly konce primerů fluorescenčně značeny, některé markery byly amplifikovány v multiplexu a některé samostatně. PCR produkty byly následně elektroforeticky separovány v agarózovém gelu a požadované fluorescenčně značené produkty byly genotypovány pomocí Rox-500 v Jižní Koreji, pomocí programu GeneMaker v. 2.6.4 byly stanoveny velikosti alel. Na základě získaných dat byla testována odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy mezi lokusy a v rámci populace za použití programu Genepop v. 4.7, k testování hybridizace byla použita pravděpodobnostní metoda Bayesovská klasifikace za využití programů Structure v. 2.3.3 a Hewhybrids v. 1.1. Lokus Cc06 neumožňoval spolehlivou detekci alel a lokusy Cbo133, Cbo235 a Cc06 byly monomorfní. Lokusy Cbo168, Cc10, Cc58 a Cc72 se významně odchylovaly od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, ale z analýzy nebyly vyřazeny. Z celkového počtu 24 jedinců, kteří byli dle morfologických znaků identifikováni jako nesyt indomalajský, bylo na základě analýzy mikrosatelitových lokusů klasifikováno jako nesyt indomalajský pouze 16 jedinců, 2 jedinci byli hybridy F2 generace, 1 jedinec byl produkt zpětného křížení s nesytem indomalajským a 1 jedinec byl nesyt bílý, další 4 jedinci byli hybridy neurčené generace. Ze 37 původně morfologicky označených intermediálních jedinců, bylo pouze 13 identifikováno jako nesyt indomalajský, 8 jako hybridy F2 generace, 4 jako nesyt bílý, 1 jedinec byl produkt zpětného křížení s nesytem indomalajským a 11 jedinců byli hybridy neurčené generace. Z 53 jedinců druhově určených dle morfologie bylo 49 z nich klasifikováno jako nesyt bílý, 2 jedinci byli hybridy neurčené generace, 1 hybrid F2 generace a 1 jedinec byl produkt zpětného křížení s nesytem indomalajským.

### 3.3.6 Mikrosatelity testované v řádu čápi

Variabilita mikrosatelitových lokusů je již téměř 17 let testována v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. V minulých letech bylo odvedeno celkem 22 prací, jejichž náplní byla *cross-species* PCR amplifikace a následná charakteristika různých polymorfních mikrosatelitových lokusů u nepříbuzných jedinců ptačích druhů řádu Ciconiiformes. Z toho celkem 3 práce se zabývaly čápem černým a v jedné práci byl současně testován čáp černý, bílý a simbil (Fišerová, 2014), zbylých 18 prací se zabývalo ostatními druhy.

U čápa bílého se celkem 7 prací zabývalo hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů pocházejících z řádu brodiví, dlouhokřídlí, plameňáci, potáplice, potápky, trubkonosí, brodiví, tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů (Obručová, 2009; Burianová, 2011; Fišerová, 2014; Gajdošíková, 2020; Krňávková, 2021; Krňávková, 2023; Macková, 2023). Čáp simbil byl testován celkem v 5 pracích na polymorfní mikrosatelitové lokusy pocházející z řádu

brodiví, veslonozí, plameňáci, potápky, tučňáci a konzervované ptačí mikrosatelity (Nevimová, 2012; Novosadová, 2012; Fišerová, 2014; Košatová, 2020; Kopecký, 2022). U nesyta bílého byla prováděna *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů izolovaných z řádu veslonozí, plameňáci a brodiví (Juračková, 2014 a Němečková, 2014). Nesyt africký byl testován *cross-species* PCR amplifikací mikrosatelitů z řádu brodiví, veslonozí, plameňáci a trubkonosí (Janyšková, 2014; Sopko, 2014; Hrabalová, 2023). U nesyta indomalajského byly testovány mikrosatelitové lokusy z řádu brodiví a trubkonosí (Konrádová, 2013; Nedvědová, 2015).

Čáp černý byl včetně této diplomové práce testován na *cross-species* PCR amplifikaci celkem ve dvou bakalářských a třech diplomových pracích a následně u něj byly charakterizovány některé testované polymorfní lokusy. Navrátilová (2009) v rámci své bakalářské práce provedla *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů izolovaných od čápů a dalších ptačích druhů dříve řazených do řádu brodiví jako jsou ibisové, volavky a kolpíci, dále od veslonožích, vrubozobých a potápek na 6 nepříbuzných jedincích čápa černého. Otestovala celkem 174 párů primerů a 21 mikrosatelitových lokusů označila jako polymorfní. Během testování zjistila, že 2 páry primerů amplifikovaly stejný lokus, proto nakonec detekovala celkem 20 nezávislých polymorfních mikrosatelitových lokusů s počtem alel 2–6 na lokus. Na její bakalářskou práci navázala Cahlíková (2011), která ve své diplomové práci provedla *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů za použití 214 párů primerů pocházejících z řádu brodiví, dlouhokřídlí, veslonozí a potáplice a na 24 nepříbuzných jedincích čápa černého charakterizovala polymorfní lokusy. Znovu otestovala 14 mikrosatelitových lokusů, které Navrátilová ve své práci (2009) označila jako monomorfní a našla mezi nimi 1 polymorfní produkt a další 2 lokusy polymorfní v práci Navrátilové (2009) označila po otestování na 24 jedincích za monomorfní. V rámci diplomové práce našla 12 polymorfních mikrosatelitových lokusů s počtem detekovaných alel 2–22 na lokus. Určila genotypy u všech 30 polymorfních mikrosatelitových lokusů, z nich 5 vykazovalo silnou vazbu na pohlaví a 6 lokusů vybrala pro rychlou, finančně nenáročnou a spolehlivou molekulární determinaci paternity u čápa černého. Fišerová (2014) se ve své diplomové práci zabývala hledáním a charakteristikou polymorfních mikrosatelitových lokusů současně u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého, bílého a simbila. Na DNA čápa černého otestovala 31 párů primerů původně navržených pro amplifikaci DNA čápa východního, volavku rusohlavou a potápku západní. U čápa černého ve své práci nenalezla žádné polymorfní lokusy.

Ve své bakalářské práci (Musilová, 2022) jsem testovala 213 mikrosatelitových lokusů a hledala jsem lokusy, které jsou polymorfní u čápa černého. Provedla jsem *cross-species* PCR amplifikaci na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa černého za použití 207 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů pro druhy z řádu trubkonosí: albatrosovitě, buňňákovité, buňňáčkovité, 5 párů primerů navržených pro druhy z řádu dlouhokřídlí: alkouna obecného, kulíka mořského a racka novozélandského a 1 páru primerů pocházejícího od lesňáčka žlutého z řádu pěvci. Nalezla jsem celkem 16 polymorfních mikrosatelitových lokusů s počtem

detekovaných alel 2–4 na lokus a u 7 párů primerů nebylo možné ani po úpravě podmínek PCR reakce získat produkt.

### 3.3.7 *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí

Řád trubkonosí (Procellariiformes) se dělí do čtyř čeledí: albatrosovití (Diomedidae), buňňákovití (Procellariidae), buňňáčkovití (Hydrobatidae) a buňňíkovití (Pelecanoididae).

Laboratoř populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Univerzity Palackého v Olomouci disponuje celkem 207 páry primerů navrženými pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů izolovaných od druhů ze všech čeledí řádu trubkonosí s výjimkou čeledi buňňíkovití, od které nemá k dispozici žádné primery.

#### Mikrosatelity izolované od druhů z čeledi albatrosovití

Z čeledi albatrosovití je v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL k dispozici celkem 53 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů pocházejících od sedmi druhů: albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), jižního (*D. antipodensis*), šedohlavého (*Thalassarche chrysostoma*), černobrvého (*T. melanophris*), laysanského (*Phoebastria immutabilis*), černonohého, (*P. nigripes*) a bělohřbetého (*P. albatrus*) původně popsané Burg (1999), Burg *et* Croxall (2001 a 2004), Dubois *et al.* (2005) a Hernandez *et al.* (2014).

#### Mikrosatelity izolované od druhů z čeledi buňňákovití

Pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů pocházejících od devíti druhů čeledi buňňákovití: buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*), taiko (*P. magentae*), havajského (*P. sandwichensis*), šedého (*Calonectris diomedea*), světlonohého (*Puffinus carneipes*), baleárského (*P. mauretanicus*), Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) a útlozobého (*Pachyptila belcheri*) je v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL k dispozici celkem 100 párů primerů navržených Techow *et* O’Ryan (2004), Bried *et al.* (2008), Lawrence (2008), Brown *et* Jordan (2009), Welch *et* Fleischer (2011), Gonzales *et al.* (2009), Hardesty *et al.* (2013), Andris *et al.* (2010), Quillfeldt *et al.* (2012) a Moodley *et al.* (2015).

#### Mikrosatelity izolované od druhů z čeledi buňňáčkovití

Z čeledi buňňáčkovití je v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL k dispozici celkem 54 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů pocházejících od tří druhů: buňňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*), dlouhokřídleho (*O. leucorhoa*) a Monteirova (*O. monteiroi*) popsané Sun *et al.* (2009), Bicknell *et al.* (2011) a Bried *et al.* (2012).

V minulosti bylo v rámci Laboratoře populační genetiky KBB PřF UPOL provedeno již 18 prací, které se věnovaly *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů izolovaných z řádu trubkonosí u nepříbuzných jedinců čápa černého (*C. nigra*), bílého (*C. ciconia*) a simbila (*C. abdimii*), nesyta afrického (*Mycteria ibis*), bílého (*M. cinerea*) a indomalajského (*M. leucocephala*), pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), bílého (*P. onocrotalus*), kadeřavého (*P. crispus*) a skvrnozobého (*P. philippensis*), potápky roháče (*Podiceps cristatus*), plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a růžového (*P. roseus*). Autoři jednotlivých prací, počet testovaných a polymorfních mikrosatelitových lokusů a počet alel detekovaných na lokus u každého studovaného druhu jsou uvedeny v Tabulce 2.

**Tabulka 2** *Cross-species* PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u ptačích druhů kladu Aequorlithornithes testovaných v Laboratoři populační genetiky KBB PřF UPOL.

<b>Autor</b>	<b>Studovaný druh (počet jedinců)</b>	<b>Testované lokusy</b>	<b>Polymorfní lokusy</b>	<b>Počet alel na lokus</b>
<b>Janušová (2015, 2017)</b>	Potápka roháč (6/13)	213	17	2–12
<b>Nedvědová (2015)</b>	Nesyt indomalajský (6)	212	45	2–5
<b>Strejčková (2016, 2018)</b>	Plameňák karibský (6/30)	213	45	2–11
<b>Kůrová (2017) Zlochová (2019)</b>	Plameňák růžový (6/22)	213	44	2–13
<b>Verešová (2018, 2020)</b>	Pelikán kadeřavý (6/41)	213	11	2–3
<b>Kopečná (2018)</b>	Pelikán africký (6)	213	24	2–3
<b>Hudzieczková (2019) Adámková (2021)</b>	Pelikán bílý (6/21)	213	36	2–7
<b>Krňávková (2021, 2023)</b>	Čáp bílý (6/23)	213	17	2–6
<b>Macková (2021)</b>	Pelikán skvrnozobý (6)	213	22	2–5
<b>Kopecký (2022)</b>	Čáp simbil (6)	213	26	2–6
<b>Musilová (2022)</b>	Čáp černý (6)	213	16	2–4
<b>Hrabalová (2023)</b>	Nesyt africký (6)	213	38	2–5

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Pro práci na experimentální části diplomové práce byly jako biologický materiál použity vzorky krve 24 nepříbuzných jedinců čápa černého (*Ciconia nigra*), pocházející z volné přírody v rámci České republiky. Za použití fenol-chloroformové metody byla z krve jedinců izolovaná genomická DNA, která byla TE pufrem zředěna na výslednou koncentraci 5–50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### 4.2 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5  $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 400  $\mu\text{l}$  každého), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachner)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina chlorovodíková (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N' - methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Rain off - tekuté stěrače (Sheron)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (AppliChem)
- Triton X-100 (Amresco)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (Applichem)

### 4.3 Použité roztoky

- **Akrylamid, 6% zásobní roztok:**
  - 420 g močoviny
  - 50 ml 10x TBE
  - 484 ml deionizované vody
  - 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N, N' - methylenbisakrylamid 19:1
  - Všechny složky rozpustit, zfiltrovat a uchovat v chladničce v tmavé láhvi
- **Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok**
  - 0,8 g dusičnanu stříbrného
  - 800 ml deionizované vody
  - Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu
- **Fix/stop roztok**
  - 80 ml ledové kyseliny octové
  - 800 ml deionizované vody
- **Hydroxid sodný o koncentraci 1 mol·l<sup>-1</sup>**
  - 40 g hydroxidu sodného
  - 1 l deionizované vody
- **Kyselina dusičná, 1% roztok:**
  - 12 ml 65% kyseliny dusičné
  - 800 ml deionizované vody
- **Nanášecí pufr:**
  - 25 ml deionizované vody
  - 100 ml formamidu
  - 0,125 g xylenové modře
  - 0,125 g bromfenolové modře
- **Peroxodisíran amonný, 10% roztok:**
  - 1 g peroxodisíranu amonného
  - 10 ml deionizované vody
  - Uchovávat v chladničce
- **Polyakrylamidový gel, 6% roztok:**
  - 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
  - 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného
  - 40 µl N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu



- **Reakční pufru pro PCR, 10x:**
  - 1,211 g trishydroxymethylaminometanu
  - 80 ml deionizované vody
  - Upravit pH pomocí kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 9,0
  - 3,73 g chloridu draselného
  - 1 ml Triton X-100
  - Rozpustit a doplnit do 100 ml
- **Roztok 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu:**
  - 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
  - 3  $\mu$ l 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu
- **TBE pufr, 10x zásobní roztok:**
  - 55 g kyseliny borité
  - 108 g trishydroxymethylaminometanu
  - 40 ml ethylendiaminotetraoctanu sodného o koncentraci 0,5 mol $\cdot$ l<sup>-1</sup>, pH 8,0
  - Doplnit do 1 l deionizovanou vodou
- **Vývojka**
  - 24 g uhličitanu sodného
  - 800 ml deionizované vody
  - Uchovat v chladničce
  - Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu$ l thiosíranu sodného

#### 4.4 Použité laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette - 0,5 až 10  $\mu$ l (osmikanálová) a 0,3  $\mu$ l až 1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu$ l až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Cleave Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA 1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER)

- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler TP XP (BIOER)
- Třepačka Orbit 1900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Ice Flaker (Brema IceMakers)

#### 4.5 PCR amplifikace DNA čápa černého

Byla provedena PCR amplifikace za použití genomické DNA dvaceti čtyř nepříbuzných jedinců čápa černého (*Ciconia nigra*). Pro každý vzorek genomické DNA jedince byla připravena PCR reakční směs s párem primerů. Níže jsou popsány jednotlivé kroky laboratorního protokolu.

1. Jednotlivé složky PCR reakční směsi rozmrazit, zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Dle Tabulky 3 napipetovat složky PCR reakční směsi do 1,5ml mikrozkušavky, připravenou směs zvortexovat a zcentrifugovat

**Tabulka 3** Složení PCR reakční směsi pro 24 vzorků.

Složka PCR směsi	Objem [ $\mu$ l]
Deionizovaná voda	168,0
Reakční pufr pro PCR (10 $\times$ )	25,4
Roztok MgCl <sub>2</sub> (25 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	15,2
Roztok dNTPs (20 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	2,7
Primer F (10 $\mu$ mol $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	12,5
Primer R (10 $\mu$ mol $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	12,5
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U $\cdot$ $\mu$ l <sup>-1</sup> )	3,8

3. Pomocí osmikanálové pipety nanést do 0,2ml PCR mikrozkušavek 1  $\mu$ l genomické DNA čápa černého. Ke genomické DNA každého vzorku následně přidat 9  $\mu$ l PCR reakční směsi.
4. Všechny 0,2ml PCR mikrozkušavky dobře uzavřít, umístit do termocyklu a nastavit teplotní program dle následujícího schématu:
  1. 94 °C: 5 min
  2. 94 °C: 30 s
  - T<sub>A</sub> °C: 30 s
  - 72 °C: 30 s
  3. 72 °C: 7 min

Teplota *annealingu* ( $T_A$ ) byla nejprve nastavena podle podmínek PCR amplifikace, které byly optimalizovány již v mé bakalářské práci (Musilová, 2022) a poté byla v případě potřeby upravována.

Za použití 16 párů primerů byla provedena *cross-species* PCR amplifikace 15 mikrosatelitových lokusů izolovaných z řádu trubkonosí (Procellariiformes) a 1 z řádu dlouhokřídlí, které jsem ve své bakalářské práci označila jako polymorfní. Přehled těchto testovaných mikrosatelitových lokusů včetně jejich zdrojového druhu je uveden v Tabulce 4.

**Tabulka 4** Testované mikrosatelitové lokusy z řádu trubkonosí, dlouhokřídlí a čápi.

Řád	Čeleď	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj	
Trubkonosí (Procellariiformes)		Albatros stěhovavý ( <i>Diomedea exulans</i> )	11H7 10C5 11H1	Dubois <i>et al.</i> , 2005	
		Albatros šedohlavý ( <i>Thalassarche chrysostoma</i> )	Dc21	Burg, 1999	
		Albatros šedohlavý, albatros stěhovavý	D6		
			Albatros bělohřbetý ( <i>Phoebastria albatrus</i> )	STAL8	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
			Buňňák bělobradý ( <i>Procellaria aequinocialis</i> )	Paequ10	Techow <i>et O'Ryan</i> , 2004
			Buňňák šedý ( <i>Calonectris diomedea</i> )	Cd3 Cd4	Bried <i>et al.</i> , 2008
		Buňňákovití (Procellariidae)	Buňňák trinidadský ( <i>Pterodroma arminjoniana</i> )	Parm03	Brown <i>et Jordan</i> , 2009
			Buňňák útlozobý ( <i>Pachyptila belcheri</i> )	Pacbel_16989 Pacbel_19907	Moodley <i>et al.</i> , 2015

Tabulka 4 Pokračování.

Řád	Čeď	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Trubkonosí (Procellariiformes)	Buřňáčkovití (Hydrobatidae)	Buřňáček dlouhokřídľý ( <i>Oceanodroma leucorhoa</i> )	Ole26	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
		Buřňáček Monteirův ( <i>O. Monteiroi</i> )	Omn8 Omn25	Bried <i>et al.</i> , 2012
Dlouhokřídľí (Charadriiformes)	Kulíkovití (Charadriidae)	Kulík mořský ( <i>Charadrius alexandrinus</i> )	Calex-01	Brown <i>et Jordan</i> , 2009 dle Küpper <i>et al.</i> , 2007
Čápi (Ciconiiformes)	Čápvití (Ciconiidae)	Čáp bílý ( <i>Ciconia ciconia</i> )	Cc10, Cc15 Cc18, Cc37 Cc42, Cc44 Cc50, Cc58 Cc61, Cc69 Cc72	Turjeman <i>et al.</i> , 2016

#### 4.6 Elektroforetická separace PCR produktů

Elektroforetická separace PCR produktů byla provedena za denaturujících podmínek v 6% polyakrylamidovém gelu o tloušťce 0,4 mm. Gel byl nalit mezi skla o rozměrech 330 × 390 mm a 330 × 420 mm. Pro separaci byla použita vyhříváná sekvenační komůrka S2 Whatman Biometra. Níže jsou popsány jednotlivé kroky použitého laboratorního protokolu.

##### Příprava gelu

1. Obě skla 2× opláchnout deionizovanou vodou a utřít do sucha papírovým ubrouskem, poté obě skla 2× opláchnout ethanolem a znovu vysušit papírovým ubrouskem.
2. Plochu většího skla, na kterou bude nalíván gel, potřít prostředkem Rain-off pro odpuzování vody. Nechat přibližně 5 min působit, poté opláchnout deionizovanou vodou a utřít do sucha.
3. Na menší sklo nanést v digestoři 1 ml roztoku 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu a důkladně rozetřít po celé ploše skla. Nechat působit přibližně 5 minut a poté 4× opláchnout ethanolem.
4. Na okraje delších stran ošetřené plochy většího skla položit spacers. Menší sklo pokládat ošetřenou plochou dolů, tak aby jeho kratší strana byla přitisknutá ke gumám spacerů. Po obou delších stranách spacersy mezi skly upevnit dvěma klipsy.

5. V kádince připravit 6% polyakrylamidový gel a důkladně ho promíchat. Připravený polyakrylamidový gel ihned nalévat mezi skla do prostoru mezi spacery. V případě potřeby rukou poklepávat na sklo, aby se zamezilo vzniku bublin.
6. Po vyplnění celého prostoru gelem zasunout hřebínek cca 0,5 cm mezi skla.
7. Pomocí čtyř klipsů v místě hřebínku sepnout skla a nechat gel alespoň hodinu polymerizovat.

#### Separace vzorků

1. Oddělat klipsy, skla opláchnout deionizovanou vodou a kartáčem vyčistit zbytky gelu, zejména prostor kolem hřebínku a skla osušit.
2. Gel umístit do elektroforetické komůrky menším sklem směrem k hliníkové desce uvnitř, upevnit pomocí šroubů.
3. Prostor kladné i záporné elektrody zalít po vyznačenou rysku 0,5× TBE pufrem, vytáhnout hřebínek a injekční stříkačkou vyčistit prostor mezi skly proudem pufru.
4. Oba elektrodové prostory elektroforetické komůrky uzavřít, zasunutím vodičů propojit komůrku se zdrojem stejnosměrného elektrického proudu. Nastavit hodnotu výkonu 90 W, hodnotu elektrického napětí 3000 V a hodnotu proudu 150 mA jako limitní faktor a gel nechat 30 minut nahřívat.
5. V průběhu nahřívání gelu nanést do připravených PCR produktů po 5  $\mu$ l nanášecího pufru a takto připravené vzorky umístit krátce před nanášením do gelu na 3 minuty do termocykleru za denaturačních podmínek. Z důvodu předejití renaturace vláken DNA produktů vložit vzorky ihned po vytažení z termocykleru do ledové tříště.
6. Vypnout zdroj stejnosměrného proudu, odpojit vodiče a otevřít prostor záporné elektrody elektroforetické komůrky. Před nanesením vzorků do gelu opět vyčistit prostor mezi skly a opatrně zasunout hřebínek cca 0,5–1 mm hluboko do gelu.
7. Osmikanálovou pipetou pomalu nanášet mezi zoubky hřebínku 2  $\mu$ l připravených vzorků.
8. Elektroforetickou komůrku uzavřít, připojit vodiče a jako limitní faktor výkonu nastavit 70 W, hodnotu elektrického napětí a proudu ponechat.
9. Po 1,5–4 hodinách separace v závislosti na relativní molekulové hmotnosti PCR produktů, vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit obě elektrody a vypustit pufr.

#### Vizualizace PCR produktů

1. S předstihem připravit fix/stop roztok, 1% HNO<sub>3</sub> a vývojku, tu uchovávat v chladničce.
2. Gel položit na vodorovnou podložku a nožem od sebe oddělit skla.

3. Menší sklo umístit do fotomisky přilepeným gelem nahoru, zalít fix/stop roztokem a nechat 20 minut působit na třepačce. Roztok poté slít zpět do baňky.
4. Gel ve fotomisce 4× propláchnout deionizovanou vodou a zalít roztokem 1% HNO<sub>3</sub>, nechat působit 4 minuty na třepačce a poté roztok vylít do odpadu.
5. Gel ve fotomisce znovu 4× propláchnout deionizovanou vodou. Do roztoku 0,1% AgNO<sub>3</sub> přidat 1200 µl formaldehydu. Gel přemístit do fotomisky pro barvení stříbrem, zalít roztokem AgNO<sub>3</sub> a nechat 30 minut barvit na třepačce.
6. Do vývojkou těsně před použitím napipetovat 1200 µl formaldehydu a 160 µl 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Roztok 0,1% AgNO<sub>3</sub> slít zpět do lahve. Gel ponořit na 5 sekund do misky s deionizovanou vodou a poté dát gel do fotomisky pro vývojku. Gel na třepačce zalít vývojkou a pozorovat vývoj hnědošedých stříbrem barvených pruhů PCR produktů. Zalít fix/stop roztokem ve chvíli, kdy jsou pruhy dostatečně výrazné, ale ještě nevystupuje tmavé pozadí. Po cca 2 minutách působení gel přibližně na 3 minuty ponořit do misky s deionizovanou vodou, nechat okapat a umístit do sušárny vyhřáté 90 °C.
7. Po vysušení gelu vyhodnotit výsledky pomocí negatoskopu a naskenovat je do počítače.
8. Vyhodnocený gel se sklem nechat několik hodin v 1mol·l<sup>-1</sup> roztoku NaOH, po sklouznutí gelu sklo umýt saponátem a může být opakovaně použito.

#### 4.7 Statistické zpracování experimentálních dat

U 15 polymorfních mikrosatelitových lokusů byly určeny genotypy 24 nepříbuzných jedinců čápa černého. Získané alelové konstituce byly následně vyhodnoceny v populačně genetickém programu Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007), který poskytl informace o pozorované  $H_O$  a očekávané  $H_E$  heterozygotnosti, Hardy-Weinbergově rovnováze, výskytu nulových alel a spolehlivosti při určování paternity. Za využití programu Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) byla testována případná vazba mezi lokusy.

## 5 Výsledky

V této diplomové práci jsem navázala na svou bakalářskou práci (Musilová, 2022), ve které jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace hledala polymorfni mikrosatelitové lokusy u čápa černého (*Ciconia nigra*). To spočívalo v otestování celkem 213 párů primerů na 6 nepříbuzných jedincích čápa černého. Z toho 207 testovaných párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů izolovaných od zástupců z řádu trubkonosí (Procellariiformes), konkrétně 53 z nich pocházelo od druhů z čeledi albatrosovití, 100 od druhů z čeledi buňňákovití a 54 od druhů z čeledi buňňáčkovití. Zbývajících 5 párů primerů pocházelo od alkouna obecného, kulíka mořského a racka novozélandského z řádu dlouhokřídlí a od lesňáčka žlutého z řádu pěvci. V mé bakalářské práci poskytlo celkem 16 mikrosatelitových lokusů polymorfni produkt se 2–4 alelami na lokus. Z nalezených polymorfni mikrosatelitových lokusů pocházelo 6 z čeledi albatrosovití, 6 z čeledi buňňákovití a 3 z čeledi buňňáčkovití z řádu trubkonosí a 1 od kulíka mořského z řádu dlouhokřídlí.

Náplní experimentální části této diplomové práce bylo provést PCR amplifikaci těchto 16 vybraných polymorfni mikrosatelitových lokusů na 24 nepříbuzných jedincích a charakterizovat jejich populačně genetické vlastnosti, to zahrnovalo určit jejich genotypy, počet alel, získat informace o heterozygotnosti, Hardy-Weinbergově rovnováze, případném výskytu nulových alel a vazbě na lokus. Dále jsem na 6 nepříbuzných jedincích otestovala 11 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů čápa bílého (Turjeman *et al.*, 2016).

Nejprve jsem provedla *cross-species* PCR amplifikaci na genomické DNA 24 nepříbuzných jedinců čápa černého a elektroforetickou separaci všech 16 mikrosatelitových lokusů za stejných podmínek jako byly uvedeny v mé bakalářské práci. Některé lokusy vyžadovaly změnu teploty *annealingu* oproti hodnotě uvedené v bakalářské práci. Lokus 11H7 při teplotě uvedené v bakalářské práci (60 °C) opakovaně netvořil žádný produkt a vyžadoval snížit teplotu až o 11 °C na 49 °C, aby poskytl hodnotitelný produkt. U lokusů 10C5, STAL8 a Pacbel\_16989 byla v PCR reakční směsi snížena koncentrace chloridu hořečnatého z původní koncentrace 1,6 mmol·l<sup>-1</sup> na koncentraci 1,2 mmol·l<sup>-1</sup>, místo původního objemu 15,2 μl bylo tedy do PCR reakční směsi pipetováno 11,4 μl chloridu hořečnatého. V PCR reakční směsi pro lokus Omn8 byla koncentrace chloridu hořečnatého naopak zvýšena a to z původní koncentrace 1,6 mmol·l<sup>-1</sup> na koncentraci 2 mmol·l<sup>-1</sup> již v bakalářské práci, do PCR reakční směsi bylo místo 15,2 μl pipetováno 19 μl roztoku chloridu hořečnatého. O stejnou hodnotu byl vždy upraven objem deionizované vody, aby byl zachován celkový objem PCR reakční směsi. Většina mikrosatelitových lokusů byla separována po dobu 1,5 hodiny. Aby bylo možné dobře odlišit jednotlivé produkty některých lokusů, bylo potřeba prodloužit dobu jejich separace až na 4 hodiny.

Z celkového počtu 16 mikrosatelitů byl potvrzen polymorfní produkt u 15 z nich. Počet alel pro jednotlivé lokusy byl v rozmezí 2–6. Nejpolymorfnější produkt poskytly 2 lokusy původně izolované od albatrosa stěhovavého. První byl lokus 11H7, u kterého jsem našla 6 alel a druhým byl lokus 10C5 s pěti alelami. Dále jsem detekovala 3 alely u lokusu Omn8 původem od buňháčka Monteirova a u lokusu Calex-01 od kulíka mořského. U zbývajících lokusů jsem našla pouze po dvou alelách. Lokus Cd4, u kterého jsem ve své bakalářské práci detekovala 2 alely, jsem po otestování na 24 jedincích označila za monomorfní. Některé lokusy (Omn8 a Parm03) neposkytovaly příliš kvalitní produkt použitelný pro další populační studie a další dva lokusy (Dc21 a Pachel\_16989) jsem kvůli velkému množství přídavných produktů, vznikajících ve stejných rozestupech jako alely a následně stěžujících hodnotitelnost, označila jako velmi problematicky hodnotitelné.

Další částí práce bylo ověřit polymorfismus 11 mikrosatelitových lokusů popsaných pro čápa bílého na čápa černém. Amplifikací 10 z nich jsem však získala monomorfní produkt a 1 lokus (Cc18) neposkytl ani při velmi nízké teplotě *annealingu* (46 °C) žádný produkt.

Provedla jsem genotypizaci 15 polymorfních mikrosatelitových lokusů u 24 nepříbuzných jedinců čápa černého a zjištěné genotypy jsem nechala statisticky zpracovat populačně genetickým programem Cervus 3.0.7, pomocí kterého jsem u každého lokusu získala data o Hardy-Weinbergově (HW) rovnováze, frekvenci výskytu nulových alel, pozorované a očekávané heterozygotnosti. Charakteristika 15 polymorfních mikrosatelitových lokusů je uvedena v Tabulce 5. Počet jednotlivých genotypů testovaných u 24 nepříbuzných jedinců pro každý polymorfní lokus, pozorovaná ( $H_O$ ) a očekávaná ( $H_E$ ) heterozygotnost jsou uvedeny v Tabulce 6. Nejpolymorfnější byly 2 lokusy: 11H7 a 10C5, u kterých bylo u každého určeno 11 různých genotypů pro 24 testovaných jedinců. Dle výsledků získaných z programu Cervus 3.0.7 bylo na 1 lokus v průměru detekováno 2,6 alel, průměrná očekávaná heterozygotnost činila 0,3897 a průměrná zjištěná vypovídací hodnota (Polymorphic information content - PIC) byla 0,3189, přičemž nejvyšší hodnotu PIC (0,703) vykazoval lokus 10C5. U lokusu Pachel\_16989 jsem zaznamenala vysokou pravděpodobnost výskytu nulových alel (59,49 %) a odchylku od HW rovnováhy na hladině významnosti 1 %. U pěti lokusů nebylo možné stanovit odchylku od HW rovnováhy. Další získanou informací byla pravděpodobnost chyby při přiřazení rodičů k mláděti a pravděpodobnost výskytu stejných alelových konstitucí u náhodně vybraných jedinců. Pravděpodobnost chyby  $18,35 \times 10^{-2}$  by byla při přiřazení prvního rodiče k mláděti za předpokladu, že není znám ani jeden z rodičů, dále  $3,86 \times 10^{-2}$  za předpokladu, že je znám 1 z rodičů a je třeba přiřadit druhého rodiče k mláděti a  $4,39 \times 10^{-3}$  v případě přiřazení páru obou rodičů. Pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce ve všech polymorfních lokusech u dvou náhodně vybraných nepříbuzných jedinců byla  $2,34 \times 10^{-6}$  a u dvou sourozenců  $20,48 \times 10^{-4}$ .



**Tabulka 5** Charakteristika 15 polymorfních mikrosatelitových lokusů amplifikovaných na DNA 24 jedinců čápa černého. V tabulce je uveden kód daného lokusu z databáze GenBank, zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel (N), doba separace ( $t_s$ ), teplota *annealingu* ( $T_a$ ), odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW) a procentuální pravděpodobnost výskytu nulových alel (P).

Lokus (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	N	$t_s$ [min]	$T_a$ [°C]	HW	P [%]
<b>11H7</b> (AY945753)	Albatros stěhovavý	F: GCAAGCTAAGTTGGGGGTAA R: ACAGTAGGGCTGCTGCAGAT	AC	6	180	49	NS	-
<b>10C5 •</b> (AY945750)		F: TGGAGATGCAATTGCCTAGA R: CAGATGAGGTTTTGGCCAGT	GA/GC	5	90	59	NS	-
<b>11F3</b> (AY945751)		F: TTTCCAGCACATTCCAACAA R: GTTCAGCCAGAAAAGCAAGC	GA/GT	2	180	56	ND	-
<b>D6</b> (AF096791)	Albatros stěhovavý a šedohlavý	F:TGGTTTGCTTCCCTCACTTC R:TTTGTCTCAGGGAAACAGGG	TC	2	120	55	ND	-
<b>Dc 21</b> (AF096802)	Albatros šedohlavý	F: CGGGGGAAGTGAAGAAGATT R: TGGACAGCCAGTGGGATAAC	CA	2	240	48	NS	-
<b>STAL8*°</b> (nevedeno)	Albatros bělohřbetý	F: CCCTGCTGGGTTTCATTTTC R: CATTGTGCAGTAGGCATGG	TG	2	90	52	NS	-
<b>Cd3</b> (EU029085)	Buňák šedý	F: TTGCCTCTTTTACAGGACTGC R: TCCCTGTGGCTAAGGATCTG	GT/CT	2	120	65	NS	9,91
<b>Paequ10</b> (AY371075)	Buňák bělobradý	F: GAAGCTGCACTGGAAGTCTG R: CATGTGGTAAGAATCCAGATG	CA	2	90	52	ND	-
<b>Pacbel_19907</b> (nevedeno)	Buňák útlozobý	F: TTTCTCCTTAGCTCGGCAGG R: CCATACTGGTGGCAGTGTG	AG	2	90	54	NS	-
<b>Pacbel_16989 •</b> (nevedeno)		F: TGCTTTTGGACAATGTGGAGG R: TCTGGTACTTCTCATTTGGAC	CA	2	90	60	**	59,49
<b>Parm03</b> (EU360819)	Buňák trinidadský	F: CTTGCTGGGTTTTGTTGGTT R: AATTGCTCAGGGAGG TGCT	CA/TA	2	90	53	NS	15,04

Tabulka 5 Pokračování.

Lokus (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	N	t <sub>s</sub> [min]	T <sub>a</sub> [°C]	HW	P [%]
<b>Ole 26</b> (FR696402)	Buřňáček dlouhokřídlý	F: TCAGCTTCTGGTGCAGTTATG R: TCCTGCTGATGGATAGGTTATG	TG	2	90	65	NS	-
<b>Omn8 ▼</b> (JQ303232)	Buřňáček Monteirův	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTA	AC	3	90	50	ND	-
<b>Omn25</b> (JQ303242)		F: TCTGCTCCCCCTGATTATTG R: ACTCTGAGAGCCATCCATCA	ATGG	2	120	50	NS	-
<b>Calex-01</b> (AM072445)	Kulík mořský	F: CTTCTCCATTGTTGTCACCTCCAGT R: GTTCTTCTTGACTTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT/GA/GC	3	90	69	ND	-

Legenda:

● - o ¼ nižší koncentrace MgCl<sub>2</sub> v PCR reakční směsi (1,2 mmol·l<sup>-1</sup>)

▼ - o ¼ vyšší koncentrace MgCl<sub>2</sub> v PCR reakční směsi (2 mmol·l<sup>-1</sup>)

NS - lokus je v souladu s HW rovnováhou

ND - lokus nelze vyhodnotit

\*\* - odchylka od HW rovnováhy na hladině významnosti 1%

**Tabulka 6** Polymorfní mikrosatelitové lokusy testované na 24 nepříbuzných jedincích čápa černého. V tabulce je uveden zdrojový druh, počet alel (N), počet genotypů (G) a pozorovaná ( $H_O$ ) a očekávaná ( $H_E$ ) heterozygotnost.

Lokus	Zdrojový druh	N	G	$H_O$	$H_E$
<b>11H7</b>		6	11	0,750	0,722
<b>10C5</b>	Albatros stěhovavý	5	11	0,792	0,759
<b>11F3</b>		2	2	0,083	0,082
<b>D6</b>	Albatros stěhovavý Albatros šedohlavý	2	2	0,125	0,120
<b>Dc21</b>	Albatros šedohlavý	2	3	0,583	0,507
<b>STAL8</b>	Albatros bělohřbetý	2	3	0,458	0,439
<b>Cd3</b>	Buřňák šedý	2	3	0,375	0,467
<b>Paequ10</b>	Buřňák bělobradý	2	2	0,083	0,082
<b>Pacbel_19907</b>	Buřňák útlozobý	2	3	0,500	0,507
<b>Pacbel_16989</b>		2	3	0,125	0,503
<b>Parm03</b>	Buřňák trinidadský	2	3	0,292	0,403
<b>Ole26</b>	Buřňáček dlouhokřídlý	2	2	0,583	0,422
<b>Omn8</b>	Buřňáček Monteirův	3	3	0,333	0,290
<b>Omn25</b>		2	2	0,583	0,422
<b>Calex-01</b>	Kulík mořský	3	3	0,125	0,121

Za použití dalšího bioinformatického programu Genepop 4.7.5 jsem ověřila, zda mezi některými testovanými lokusy není vazba. Žádná z dvojic mikrosatelitových lokusů nebyla ve vazbě. Všech 15 polymorfních mikrosatelitových lokusů bylo následně prověřeno společně s 30 polymorfními lokusy dříve testovanými na čápovi černém (Cahlíková, 2011). Na základě výsledků byla detekována 100% vazba lokusu Ole26 s lokusy Sn2A36 a Eru03 a o něco slabší vazba s lokusem WS $\mu$ 20. Lokusy jsou ve vazbě, je-li hodnota P-value menší než 0,0002. Hodnota P-value mezi lokusy Ole26 a Sn2A36 vypočtena programem Genepop byla rovna 0, což vypovídá o absolutní vazbě mezi lokusy. Mezi lokusy Ole26 a WS $\mu$ 20 byla vypočtena hodnota P-value 0,000034, což také vypovídá o velmi silné vazbě. Lokusy ve vazbě, které byly testované v této diplomové práci a v diplomové práci Cahlíkové (2011) včetně hodnoty P-value vypočtené programem Genepop 4.7.5 jsou uvedeny v Tabulce 7.

**Tabulka 7** Hodnoty P-value mezi vybranými dvojicemi mikrosatelitových lokusů testovaných v této diplomové práci a v diplomové práci Cahlíkové (2011) u čápa černého ve vazbě.

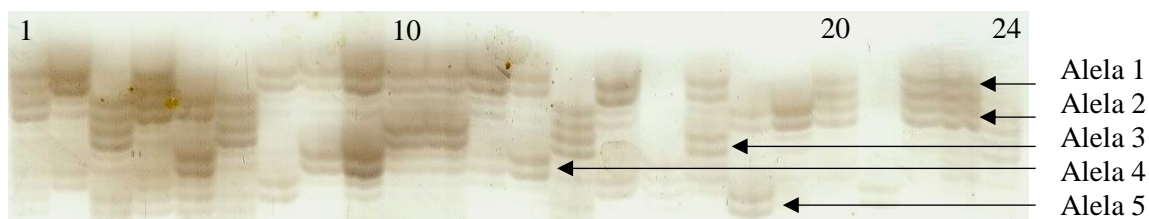
Dvojice mikrosatelitových lokusů		P-value
Ole26	Eru03	0,000000
Ole26	Sn2A36	0,000000
Ole26	WSμ20	0,000034
Eru03	Sn2A36	0,000000
Sn2A36	WSμ20	0,000006
Eru03	WSμ20	0,000008

Na základě genotypizace jsem dále zjistila, že u lokusu Ole26 se mezi 24 nepříbuznými jedinci čápa černého vyskytují pouze 2 genotypy, jeden homozygotní u všech samců (1/1) a druhý heterozygotní u všech samic (1/2). Vzhledem k tomu, že samci jsou homogametičtí ZZ a samice heterogametické ZW, genotypy těchto markerů přesně korespondují s pohlavím jedinců, pravděpodobně tedy lokus Ole26 i lokusy Eru03, Sn2A36 a Wsμ20 (Cahlíková, 2011) leží na pohlavním chromozomu Z. Na níže uvedeném schématu uvádím pravděpodobnou vzájemnou pozici těchto lokusů Eru03, Ole26, Sn2A36 a Wsμ20 na chromozomu:

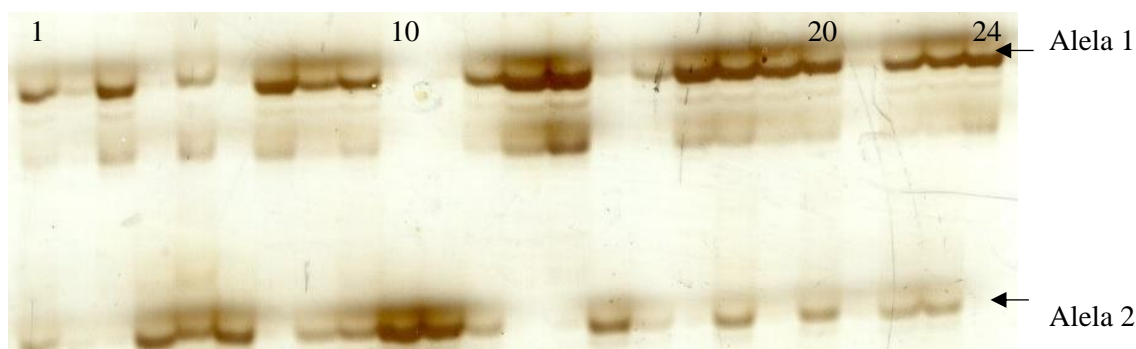
---Ole26-Eru03-Sn2A36---Wsμ20---

Na další straně je uveden příklad některých elektroforeticky separovaných PCR produktů vybraných polymorfních mikrosatelitových lokusů nalezených u 24 nepříbuzných jedinců čápa černého. Některé lokusy byly hůře hodnotitelné kvůli velkému množství přídatných produktů, které vznikaly ve stejných rozestupech jako alely a ztěžovaly hodnotitelnost. Na obrázcích 2–5 jsem vybrala mikrosatelitové lokusy 10C5, Pacbel\_19907, 11F3 a Ole 26, které bylo možné spolehlivě vyhodnotit. U každého lokusu jsem pro přehlednost označila jedince č. 1, 10, 20 a 24. Jednotlivé alely jsou vyznačeny šipkami.

Na obrázku 3 jsou elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu 10C5, který je jeden ze dvou nejpolymorfnějších lokusů, u kterého bylo nalezeno 5 alel a 11 různých genotypů. Přestože u tohoto lokusu vznikaly další přídatné produkty, bylo možné určit genotypy všech 24 jedinců. Na obrázku 4 jsou elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Pacbel\_19907, u kterého byly nalezeny 2 alely a určeny 3 různé genotypy. Některé vzorky (2 a 21) jsou na této fotografii méně zřetelné, ale byly nezávisle genotypovány na jiném gelu. Na obrázku 5 je uveden lokus 11F3, u kterého byly detekovány 2 alely a nalezeny 2 různé genotypy. Na obrázku 6 je uveden lokus Ole26 se 2 alelami, u kterého byly určeny 2 genotypy přesně korespondující s pohlavím jedinců. Na této fotografii chybí jedinec č. 19.



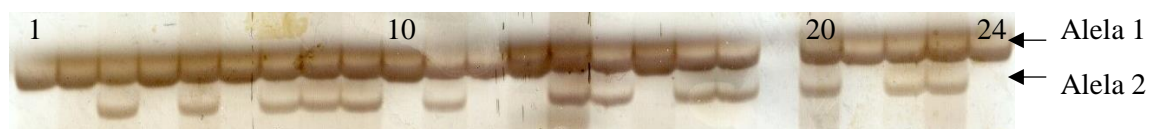
**Obrázek 3** Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu 10 C5 s 5 alelami u 24 nepříbuzných jedinců čápa černého při teplotě annealingu 59 °C.



**Obrázek 4** Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Pacbel\_19907 se 2 alelami u 24 nepříbuzných jedinců čápa černého při teplotě annealingu 54 °C.



**Obrázek 5** Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu 11F3 se 2 alelami u 24 nepříbuzných jedinců čápa černého při teplotě annealingu 56 °C.



**Obrázek 6** Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Ole26 se 2 alelami u 24 nepříbuzných jedinců čápa černého při teplotě annealingu 65 °C. Na obrázku chybí jedinec č.19.

## 6 Diskuze

V experimentální části této diplomové práce jsem charakterizovala mikrosatelitové lokusy z řádu trubkonosí. Navázala jsem tak na svou bakalářskou práci (Musilová, 2022), kde jsem hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy u 6 jedinců čápa černého. V této práci jsem tyto lokusy genotypovala na genomické DNA 24 nepříbuzných jedinců čápa černého a popsala jsem jejich vlastnosti za využití populačně genetických programů Cervus 3.0.7 a Genepop 4.7.5. Protože se jedná o sesterský druh, ověřila jsem dalších 11 mikrosatelitových lokusů, popsanych pro čápa bílého (Turjeman *et al.*, 2016), na polymorfismus u čápa černého.

V bakalářské práci jsem z celkového počtu 213 testovaných mikrosatelitových lokusů našla 16 polymorfních lokusů z řádu trubkonosí a dlouhokřídli. Jejich amplifikací na 24 nepříbuzných jedincích čápa černého poskytlo polymorfní produkt 15 z nich. Jeden lokus (Cd4), který byl v bakalářské práci vyhodnocen jako dvoualelový se dvěma genotypy, jsem v této diplomové práci vyhodnotila jako monomorfní. V bakalářské práci jsem u tohoto lokusu zřejmě mylně jako polymorfní vyhodnotila nějaký PCR artefakt, který se v diplomové práci již nezopakoval. Lokusy Parm03 a Omn8 byly obtížně hodnotitelné a lokusy Dc21 a Pacbel\_16989 jsem označila jako velmi problematicky hodnotitelné kvůli velkému množství přídatných produktů, které vznikaly v podobném rozestupu jako alely a ztěžovaly hodnotitelnost. Nelze se tedy plně spolehnout na naprosto správné vyhodnocení těchto genotypů a nedoporučovala bych je pro další populační studie u čápa černého. Pro mikrosatelitové lokusy popsane pro čápa bílého (Turjeman *et al.*, 2016) jsem testovala PCR s 11 párů primerů, z nich 10 poskytlo monomorfní produkt a 1 (Cc18) ani po opakovaném testování a snížení teploty *annealingu* až na 46 °C neposkytl žádný produkt.

Z čeledi albatrosovití pocházelo celkem 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Lokusy 11H7, 10C5 a 11F3 byly izolovány od albatrosa stěhovavého (Dubois *et al.*, 2005). Testování na 20 nepříbuzných jedincích albatrosa stěhovavého našli při  $T_a$  58 °C u lokusu 11H7 10 alel a u lokusů 10C5 a 11F3 po 3 alelách. Při testování těchto lokusů na 24 nepříbuzných jedincích čápa černého v mé diplomové práci jsem u lokusu 11H7 při  $T_a$  49 °C našla 6 alel, u lokusu 10C5 při  $T_a$  59 °C jsem našla 5 alel a u lokusu 11F3 při  $T_a$  56 °C pouze 2 alely. Lokus Dc21 popsany pro albatrosa šedohlavého poskytl PCR amplifikací při  $T_a$  48 °C u 50 jedinců albatrosa černobrvého 4 alely, 3 alely u 90 jedinců albatrosa stěhovavého a u 50 jedinců albatrosa šedohlavého byl monomorfní (Burg, 1999). Lokus D6 popsany pro albatrosa šedohlavého a stěhovavého byl u albatrosa šedohlavého, stěhovavého i černobrvého vyhodnocen jako monomorfní (Burg, 1999). V této diplomové práci jsem amplifikací na 24 nepříbuzných jedincích čápa černého u lokusů Dc21 při  $T_a$  48 °C a D6 při  $T_a$  55 °C detekovala po dvou alelách. Lokus STAL8 izolovaný od albatrosa severního (Hernandez *et al.*, 2014) poskytl polymorfní produkt se 2 alelami u 3 jedinců albatrosa bělohřbetého při  $T_a$  60 °C, u 36 jedinců albatrosa černonohého

a 12 jedinců albatrosa laysanského byl monomorfní. Ve své diplomové práci jsem při  $T_a$  52 °C rovněž detekovala pouze 2 alely.

Z čeledi buňňákovití pocházelo 5 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Lokus Paequ10 byl izolován od buňňáka bělobradého. U 69 jedinců bylo při  $T_a$  55 °C detekováno 7 alel. (Techow *et O' Ryan*, 2004). U lokusu Cd3 izolovaného od buňňáka šedého bylo u 43 jedinců při  $T_a$  58 °C detekováno 5 alel (Bried *et al.*, 2007), u lokusu Parm03 izolovaného od buňňáka trinidadského bylo detekováno u 260 jedinců při  $T_a$  55 °C 9 alel (Brown *et Jordan*, 2009). Lokusy Pacbel\_16989 a Pacbel\_19907 byly izolovány od buňňáka útlozobého. Lokusy byly amplifikovány při  $T_a$  53 a 56 °C, u lokusu Pacbel\_16989 bylo detekováno 10 alel u 75 jedinců a u lokusu Pacbel\_19907 bylo detekováno 8 alel u celkem 74 jedinců (Moodley *et al.*, 2015). V této diplomové práci jsem testováním na 24 nepříbuzných jedincích čápa černého všechny tyto lokusy Paequ10 při  $T_a$  52 °C, Cd3 při  $T_a$  65 °C, Parm03 při  $T_a$  53 °C, Pacbel\_16989 při  $T_a$  60 °C a Pacbel\_19907 při  $T_a$  54 °C vyhodnotila jako dvoualelové.

Z čeledi buňňáčkovití pocházely 3 polymorfní mikrosatelitové lokusy. Lokus Ole26 byl izolován od buňňáčka dlouhokřídlého a u 47 jedinců při  $T_a$  60 °C byly detekovány 2 alely (Bicknell *et al.*, 2011). Lokusy Omn8 a Omn25 byly izolovány od buňňáčka Monteirova. U celkem 125 testovaných jedinců detekovali při  $T_a$  58 °C u lokusu Omn8 10 alel a u lokusu Omn25 5 alel (Bried *et al.*, 2012). Ve své diplomové práci jsem u lokusu Ole26 při  $T_a$  65 °C našla stejně jako autoři pouze 2 alely. Při  $T_a$  50 °C jsem jako dvoualelový jsem vyhodnotila i lokus Omn25 a u lokusu Omn8 jsem detekovala 3 alely.

Polymorfní lokus Calex-01 pocházel od kulíka mořského z čeledi kulíkovití řádu dlouhokřídlí (Küpper *et al.*, 2007). U 42 jedinců při  $T_a$  62 °C bylo detekováno 10 alel. *Cross-species* PCR amplifikací provedenou na 340 jedincích buňňáka trinidadského bylo při  $T_a$  55 °C detekováno celkem 5 alel (Brown *et Jordan*, 2009). Testováním tohoto lokusu na 24 nepříbuzných jedincích čápa černého jsem detekovala 3 alely při  $T_a$  69 °C.

V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty univerzity Palackého v Olomouci poskytlo těchto 15 mikrosatelitových lokusů polymorfní produkt při *cross-species* PCR amplifikaci u dalších 11 ptačích druhů kladu Aequorlornithes. Jednotlivé druhy včetně testovaných jedinců a počet společných alel jsou uvedeny v Tabulce 8. Nejčastěji polymorfní byl lokus Omn8, který PCR amplifikací poskytl polymorfní produkt u 11 druhů z celkového počtu 12 testovaných druhů s počtem 3–8 alel, dále lokus Calex-01, který byl polymorfní celkem u 7 druhů se 2–3 detekovanými alelami. Naopak nejmenší polymorfismus napříč druhy vykazoval lokus 11F3, který byl kromě čápa černého polymorfní pouze u nesyta afrického, u kterého byly detekovány 4 alely (Hrabalová, 2023). Čáp černý sdílí nejvíce polymorfních mikrosatelitových lokusů s nesytem africkým (Hrabalová, 2023)

a indomalajským (Nedvědová, 2015), kdy s každým z nich sdílí 7 polymorfních lokusů se 2–4 alelami. Celkem 5 lokusů: Omn8, Omn25, 11H7, Pacbel\_19907 a 10C5 je polymorfních zároveň u všech těchto 3 druhů. Lokus 11H7 poskytl u čápa černého polymorfní produkt se 6 alelami, což bylo nejvíce detekovaných alel na lokus v této diplomové práci. Tento lokus byl polymorfní u nesyta afrického (Hrabalová, 2023) a indomalajského (Nedvědová, 2015) a čápa simbila (Kopecký, osobní sdělení), u všech těchto druhů bylo detekováno po 2 alelách. Nejméně polymorfních lokusů sdílí čáp černý s pelikánem kadeřavým (Verešová, 2020) a plameňákem karibským (Šuláková, 2019), kdy s oběma druhy sdílí pouze po jednom polymorfním lokusu.



**Tabulka 8** Polymorfnní mikrosatelitové lokusy u čápa černého v této diplomové práci v porovnání s dalšími ptačími druhy kladu Aequorlitorניתhes, u kterých byl v rámci Laboratoře populační genetiky KBB PřF UPOL testován jejich polymorfismus. Testováno bylo 11 druhů: nesyt africký (Hrabalová, 2023), nesyt indomalajský (Nedvěďová, 2015), čáp simbil (Kopecký, osobní sdělení), pelikán bílý (Adámková, 2021), potápka roháč (Janušová, 2019), pelikán skvrnozobý (Macková, 2021), pelikán africký (Kopečná, 2020), plameňák růžový (Zlochová, 2019), čáp bílý (Krňávková, 2023), pelikán kadeřavý (Verešová, 2020) a plameňák karibský (Šuláková, 2019). Pořadí druhů je dle počtu společných polymorfnních lokusů s čápem černým, číslem je označen počet alel a písmenem M monomorfní produkt, v závorce je uveden počet testovaných jedinců,  $\Sigma$ druhy značí počet druhů, u kterých je lokus polymorfnní a  $\Sigma$ lokusy značí počet polymorfnních lokusů u druhu.

Lokus	Testovaný druh												$\Sigma$ druhy
	Čáp černý (24)	Nesyt africký (6)	Nesyt indomalajský (6)	Čáp simbil (10)	Pelikán bílý (21)	Potápka roháč (13)	Pelikán skvrnozobý (6)	Pelikán africký (12)	Plameňák růžový (22)	Čáp bílý (23)	Pelikán kadeřavý (41)	Plameňák karibský (30)	
Omn8	3	3	4	7	7	6	4	3	8	6	M	3	<b>11</b>
Calex-01	3	M	2	2	3	M	2	M	2	M	3	M	<b>7</b>
11H7	6	2	2	2	M	M	M	M	M	M	M	M	<b>4</b>
Ole26	2	M	3	M	3	M	M	2	M	M	M	M	<b>4</b>
Omn25	2	3	2	3	M	M	M	M	M	M	M	M	<b>4</b>
Pacbel_19907	2	3	2	2	M	M	M	M	M	M	M	M	<b>4</b>
10C5	5	3	2	M	M	M	M	M	M	M	M	M	<b>3</b>
Cd3	2	M	M	M	4	M	M	2	M	M	M	M	<b>3</b>
STAL8	2	2	M	M	M	2	M	M	M	M	M	M	<b>3</b>
Parm03	2	M	M	M	M	5	M	M	M	M	M	M	<b>2</b>
11F3	2	4	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	<b>2</b>
Dc21	2	M	M	M	M	M	2	M	M	M	M	M	<b>2</b>
Pacbel_16989	2	M	M	2	M	M	M	M	M	M	M	M	<b>2</b>
Paequ10	2	M	M	M	M	M	M	M	M	2	M	M	<b>2</b>
<b><math>\Sigma</math> lokusy</b>	<b>14</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	

Ptačí druhy z kladu Aequorlornithes uvedené v Tabulce 8, u kterých byly nalezeny tyto polymorfni mikrosatelitové lokusy, pocházejí z různých řádů: Ciconiiformes, Pelecaniformes, Phoenicopteriformes a Podicipediformes. Zajímavé je, že počet polymorfni lokusů u jednotlivých druhů úplně nekoresponduje s fylogenetickými vztahy uvnitř kladu Aequorlornithes. Z hlediska zařazení jednotlivých druhů do systému jsou nejpříbuznější čápi a nesytí (Prum *et al.*, 2015), proto bylo očekáváno, že tyto druhy budou sdílet nejvíce polymorfni lokusů. U čápa černého, simbila a bílého se jedná o sesterské druhy, čáp černý však s čápem bílým sdílí pouze 2 polymorfni lokusy, sdílené lokusy s nesytem africkým a indomalajským odpovídají očekávání. Naopak s fylogeneticky vzdálenějšími druhy: pelikánem bílým, skvrnozobým nebo dokonce potápkou roháčem má čáp černý více společných polymorfni lokusů než s čápem bílým. V rámci rodu pelikán spolu sdílejí pelikán bílý, skvrnozobý, africký a kadeřavý pouze 1–3 polymorfni lokusy. Stejně tak plameňák růžový a karibský a potápka roháč, která je součástí jejich sesterského kladu mají navzájem společné pouze 1–2 polymorfni lokusy.

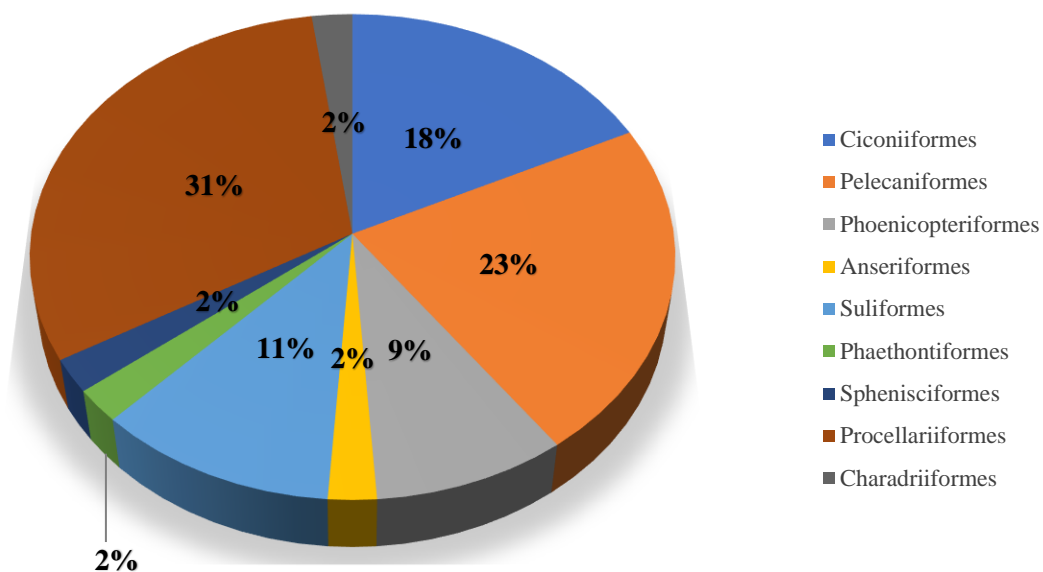
Některé mikrosatelitové lokusy u mnoha druhů, přestože byly testovány na výrazně menším počtu jedinců, poskytly PCR amplifikaci polymorfni produkt s více alelami než jsem našla u čápa černého na 24 jedincích. Například u lokusu Omn8 byly u čápa černého nalezeny 3 alely, zatímco u plameňáka růžového bylo nalezeno 8 alel, u pelikána bílého a čápa simbila 7 alel a u čápa bílého 6 alel. U čápa černého se vzhledem k poklesu četnosti a opětovnému nárůstu jeho populace v minulosti, velmi pravděpodobně odráží nižší variabilita druhu, což by mohlo být považováno za výsledek efektu hrdla lahve (Hampl, 2007).

U čápa černého bylo v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky testováno na polymorfismus celkem 636 párů primerů, které byly navrženy pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů pocházejících od zástupců kladu Aequorlornithes. Polymorfni produkt poskytlo celkem 45 z nich, což činí 7,1% úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace. Na 24 nepříbuzných jedincích čápa černého bylo kromě 15 polymorfni lokusů z této diplomové práce již dříve charakterizováno dalších 30 polymorfni lokusů (Cahlíková, 2011), které vykazovaly 2–22 alel. Cahlíková (2011) ve své práci za využití programu Genepop 4.0.10 zaznamenala vazbu mezi některými testovanými lokusy. Konkrétně lokusy Eru03 a Sn2A-36 vykazovaly hodnotu P-Value rovnou 0, což vypovídá o absolutní vazbě mezi lokusy. Dvojice lokusů Eru03 a WSμ20 a dvojice Sn2A-36 a WSμ20 vykazovaly hodnotu P-Value 0,00002, což značí také velmi silnou vazbu. Lokusy Cc01, Cc02, WSμ20 a Eru03 vykazovaly u všech ze 14 testovaných samic homozygotní genotypy. Předpoklad, že tyto polymorfni lokusy jsou vázány na pohlaví, konkrétně na chromozom Z, Cahlíková (2011) ověřila otestováním dalších 12 samic čápa černého, u kterých pro tyto lokusy získala opět pouze homozygotní genotypy. Samci byli homozygoti i heterozygoti. Locus Sn2A-36 byl také vázán na

pohlaví, u všech samic však vykazoval heterozygotní genotypy, pravděpodobně je lokus též lokalizován na chromozomu Z. Samice je heterogametická (ZW) a má tedy jen jednu kopii chromozomu Z a i když se jeví jako homozygot, je ve skutečnosti hemizygotní s jednou kopií. Samec, který má 2 kopie chromozomu Z, může být heterozygot i homozygot (Snustad *et* Simmons, 2017).

Ve své diplomové práci jsem využila program Genepop 4.7.5 pro detekci případné vazby mezi lokusy. Z 15 polymorfních lokusů nevykazovala vazbu žádná dvojice lokusů, tyto lokusy jsem následně prověřila společně s lokusy testovanými v práci Cahlíkovou (2011), ale 1 lokus z mé diplomové práce (Ole26) vykazoval vazbu s několika dříve testovanými lokusy v její práci. U lokusu Ole26 byla s lokusy Eru03 a Sn2A36 zjištěna P-Value rovna 0, což značí absolutní vazbu, mezi lokusy Ole26 a WSμ20 byla hodnota P-Value 0,000034, což vypovídá o velmi silné vazbě mezi těmito lokusy. Rovněž jsem při genotypizaci 24 nepříbuzných jedinců čápa černého u lokusu Ole26 zaznamenala výskyt pouze 2 genotypů, všichni samci byli homozygotní (genotyp 1/1) a samice heterozygotní (genotyp 1/2). To vypovídá o tom, že lokus Ole26 je pravděpodobně lokalizován na pohlavním chromozomu Z. Porovnáním tohoto lokusu s ostatními lokusy označenými jako vázané na pohlaví jsem zjistila, že u všech 24 nepříbuzných jedinců čápa černého vykazuje Ole26 totožné genotypy s lokusem Sn2A36 a stejný typ vazby na pohlavní chromozom Z. Po srovnání sekvencí těchto dvou lokusů v GenBank jsem zjistila, že se nejedná o totožný lokus amplifikovaný dvěma různými páry primerů, ale opravdu o dva různé lokusy.

Celkem bylo na čápu černém v rámci Laboratoře populační genetiky KBB PřF UPOL testováno 636 párů primerů. Testované mikrosatelitové lokusy pocházely z řádu brodiví, který v dřívějším pojetí navíc zahrnoval kolpíky, ibise, volavky a kvakoše, dále z řádu dlouhokřídlí, plameňáci, potáplice, veslonoží a trubkonosí (Sibley *et* Ahlquist, 1988). Celkem 45 polymorfních lokusů bylo charakterizováno na 24 nepříbuzných jedincích, přibližně 10 mikrosatelitových lokusů je možné použít pro analýzu paternity (Cahlíková, 2011), pro běžné populační studie lze využít veškeré tyto markery. Problémem těchto stávajících polymorfních mikrosatelitových lokusů vzhledem k nízké genetické variabilitě čápa černého zůstává převaha lokusů s nízkým polymorfismem (převážně dvoualelových). Celkem 14 polymorfních lokusů pocházelo z řádu Procellariiformes, dalších 10 polymorfních lokusů pocházelo z řádu Pelecaniformes, 8 lokusů z řádu Ciconiiformes, 5 lokusů z řádu Suliformes, 4 lokusy z řádu Phoenicopteriformes a z řádů Anseriformes, Phaethontiformes, Sphenisciformes a Charadriiformes pocházelo vždy po jednom polymorfním lokusu. Procentuální zastoupení polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa černého vzhledem k jejich zdrojovému řádu podle nového systému je znázorněno na Obrázku 7.



**Obrázek 7** Procentuální zastoupení polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa černého vzhledem ke zdrojovému řádu podle nového systému (Prum *et al.*, 2015).

Do budoucna u čápa černého zbývá otestovat na polymorfismus mikrosatelitové lokusy pocházející z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity, které jsou v Laboratoři populační genetiky KBB PřF UPOL k dispozici a mohly bytak být u čápa černého nalezeny další polymorfní lokusy s vyšším počtem alel pro přesnější populační studie.

## 7 Závěr

Ve své diplomové práci jsem navázala na svou bakalářskou práci (Musilová, 2022). V experimentální části této diplomové práce jsem charakterizovala mikrosatelitové lokusy z řádu trubkonosí (Procellariiformes) a dlouhokřídli (Charadriiformes), které jsem označila jako polymorfní v mé předchozí bakalářské práci, na genomické DNA 24 nepříbuzných jedincích čápa černého (*Ciconia nigra*). Dále jsem testovala 11 mikrosatelitových lokusů popsaných u čápa bílého (*Ciconia ciconia*) (Turjeman *et al.*, 2016).

U 24 nepříbuzných jedinců čápa černého poskytlo celkem 15 mikrosatelitových lokusů polymorfní produkt s 2–6 alelami na lokus. Celkem 14 polymorfních lokusů pocházelo z řádu trubkonosí a 1 lokus od kulíka mořského z řádu dlouhokřídli. Z 11 testovaných mikrosatelitových lokusů izolovaných od čápa bílého nebyl žádný polymorfní.

Za využití populačně genetického programu Cervus 3.0.7 jsem stanovila odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, frekvenci výskytu nulových alel a očekávanou a pozorovanou heterozygotnost. Průměrný počet alel detekovaných na lokus byl 2,6 a průměrná očekávaná heterozygotnost činila 0,3897. Pomocí programu Genepop 4.7.5 jsem ověřila, zda mezi některými lokusy není vazba. Žádný z testovaných párů nebyl ve vazbě, všech 15 polymorfních lokusů charakterizovaných v mé diplomové práci bylo následně prověřeno s 30 polymorfními lokusy testovanými v předchozí práci (Cahlíková, 2011) a byla detekována absolutní vazba lokusu Ole26 s lokusy Sn2A36 a Eru03 a slabší vazba s lokusem WSμ20. Dále bylo zjištěno, že u lokusu Ole26 se vyskytují pouze 2 genotypy, všichni samci jsou homozygotní s genotypem 1/1 a samice heterozygotní s genotypem 1/2. Tento lokus se pravděpodobně nachází na pohlavním chromozomu Z.

## 8 Použitá literatura

Abdurakhmonov, I. Y. (Ed.) (2016): *Microsatellite Markers*. IntechOpen, Rijeka.

Abu Shnaf, A. S. M., Al-Khalifa, M. S. (2023): First constitutive heterochromatin characterization and karyotype of white stork *Ciconia ciconia* (Aves: Ciconiidae). *Brazilian Journal of Biology*, 83, 1–7.

Amat, J.A., Green, A. J. (2010): *Waterbirds as Bioindicators of Environmental Conditions. Conservation Monitoring in Freshwater Habitats*. Springer, Dordrecht, dostupné online na: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9278-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9278-7_5), navštíveno dne 24. 3. 2024.

Anonymous (2011): Čápi černí málem zmizeli z naší přírody. *ZOO report Brno*, 1–4.

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.

Belterman, R. H. R., De Boer, L. E. M. (1990): A miscellaneous collection of bird karyotypes. *Genetica* 83, 17–29.

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.

Bobek, M., Hampl, R., Peške, L., Pojer, F., Šimek, J., Bureš, S. (2008): African Odyssey project: satellite tracking of black storks (*Ciconia nigra*) breeding at a migratory divide. *Journal of Avian Biology*, 39, 500–506.

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*. Manuskript, dostupné online na: <https://www.yumpu.com/en/document/view/39976169/eighteen-polymorphic-microsatellite-markers-in-monteiros-storm>, navštíveno dne 16. 3. 2024

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.

Brouwer, J. R., Willemsen, R., Oostra B. A. Microsatellite repeat instability and neurological disease. *Bioessays*, 71–83.

- 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 greyheaded 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.
- Burianová, E. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Dawson D. A., Horsburgh G., Küpper C., Stewart I. R. K., Ball A. D., Durrant K. L., Hansson B., Bacon II., Bird S., Klein Á., Krupa A. P., Lee J.-W., Martín-Galvéz D., Simeoni M., Smith G., Spurgin L. G., 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.
- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. (1992): *Handbook of the Birds of the World*. Vol.1. Lynx Editions, Barcelona, 1–696.
- Dieringer, D., Schlötterer, Ch. (2003): Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3, 167–169.
- Dubois, M. P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 905–907.
- Elliott, A., Christie, D. A., Garcia, E. F. J., Boesman, P. F. D. (2020): Black Stork (*Ciconia nigra*). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA, dostupné online na: <https://doi.org/10.2173/bow.blasto1.01>, navštíveno dne 24. 3. 2024.
- Fecek C., Emmady P. D. (2023): Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. StatPearls, dostupné online na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32644454/>, navštíveno dne 24. 3. 2024.

- Feldman Turjeman, S., 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*, 39.1, 11–16.
- Fišerová, E. (2014): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), černého (*C. nigra*) a simbila (*C. abdimii*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Gajdošíková, T. (2020): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Gemayel, R., Cho, J., Boeynaems, S., Verstrepen, K. J. (2012): Beyond junk-variable tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. *Genes*, 3, 461–480.
- Ghimire, P., Palacios, C., Tremble, J., Lamichhaney, S. (2023): Unraveling cryptic diversity: Genomic approaches to study the taxonomy and evolution of Woolly-necked storks using museum specimens. Dostupné online na: <https://doi.org/10.1101/2023.11.22.568311>. Navštíveno dne 24. 3. 2024.
- 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.
- Habbane, M., Montoya, J., Rhouda, T., Sbaoui, Y., Radallah, D., Emperador, S. (2021): Human Mitochondrial DNA: Particularities and Diseases. *Biomedicines*, 9, 1364.
- Hampl, R. (2007): Biology of Black Stork: diet, migration and reproduction. Disertační práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Hampl, R., Beran, V., Dolata, P. T. (2007): Potrava mláďat čápa černého (*Ciconia nigra*) v České republice a v Polsku. *Sylvia*, 43, 165–172.
- Handley, L. L., Ceplitis, H., Ellegren, H., (2004): Evolutionary Strata on the Chicken Z Chromosome: Implications for Sex Chromosome Evolution. *Genetics*, 167, 367–376.
- 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.
- Havecker, E. R., Gao, X., Voytas, D. F. (2004): The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology*, 5, 225.



- 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.
- Holmes, N., G. (1994): Microsatellite markers and the analysis of genetic disease. *British Veterinary Journal*, 150, 411–421.
- Hora, J., Kloubec, B., Šťastný, J. (2015): Ptáci jižních Čech, Jihočeský kraj, České Budějovice.
- Hrabalová, S. (2023): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta afrického (*Mycteria ibis*). Bakalářská práce. PřF UPOL, Olomouc.
- Hudec, K., Šťastný, K. a kol. (2016): Fauna ČR, Ptáci 1, Academia, Praha.
- Hudzieczková, A. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Hutchins, M., Jackson, A. J., Bock, W. J., Olendorf, D., (Ed.) (2002): Grzimek's Animal Life Encyclopedia, Gale Group, Farmington Hills, MI.
- Chevallier, D., Maho, Y., Baillon, F., Duponnois, R., Dieulin, C., Brossault, P., Franclieu, P., Lorge, P., Aurouet, A., Massemin, S. (2010): Human activity and the drying up of rivers determine abundance and spatial distribution of Black Storks *Ciconia nigra* on their wintering grounds. *British Trust for Ornithology, Bird Study*, 57, 369–380.
- 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.
- Janušová, D. (2017): Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorhithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Juračková, N. (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u nesyta bílého (*Mycteria cinerea*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kaminsin, D., Warrit, N., Sankhom, R., Piamsanga, K., Sanannu, S., Baicharoen, S., Wiwegweaw, A. (2023): Detecting introgressive hybridization to maintain genetic integrity in endangered large waterbird: a case study in milky stork. *Scientific Reports*, 13, 8892.

Kantartzi, S. K., (Ed.) (2013): *Microsatellites: methods and protocols*. Methods in molecular biology, v. 1006. Humana Press ; Springer, New York.

Konrádová, D. (2013): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Kopečná, K. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). 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. (2021): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Krňávková, P. (2023): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce. PřF UPOL, Olomouc.

Kumar, S., Palve, A., Patel, S. K., Selvanayagam, S., Sharma, R., Rathore, A. (2020): Development of genomic microsatellite markers in cluster bean using next-generation DNA sequencing and their utility in diversity analysis. *Current Plant Biology*, 21, 100134.

Küpper, C., Horsburgh, G. J., Dawson, D. A., French-Constant, R., Szekely, T., Burke, T. (2007) Characterization of 36 polymorphic microsatellite loci in the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) including two sex-linked loci and their amplification in four other Charadrius species. *Molecular Ecology Notes*, 7, 35–39.

Kůrová, V. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská 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 (*Pterodroma magentae*). Dissertation. Auckland, New Zealand, dostupné online na <https://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>, navštíveno dne 16. 3. 2024.

Lee, A. T. K., Whitecross M. A., Smit-Robinson, H. A., Allan, D. G., van den Heever, L., Jenkins, A., Retief, E. F., Colyn, R., B., Tarboton, W., Chetty, K., Brink, Ch., W. (2023): A review of the conservation status of Black Stork *Ciconia nigra* in South Africa, Lesotho, and Eswatini. *Bird*

Conservation International, 33, e56, 1–15. Dostupné online na: <https://doi.org/10.1017/S0959270923000059>, navštíveno dne 24. 3. 2024.

Liang, W. L., Zhu, J., Ren, Z. M. (2019): Complete mitochondrial genome of *Ciconia nigra* (Ciconiiformes: Ciconiidae), a threatened stork in China. *Mitochondrial DNA Part B*, 4, 2509–2510.

Liao, X., Zhu, W., Zhou, J., Li, H., Xu, X., Zhang, B., Gao, X. (2023): Repetitive DNA sequence detection and its role in the human genome. *Communications Biology*, 6, 954.

Llanes–Quevedo, A., Gonzáles, M. A., Mena, R. C., Frankel, C., Lopez, G. E. (2018): Microsatellite variability of the wood stork *Mycteria americana* (Aves, Ciconidae) in Cuba: implications for its conservation. *Animal Biodiversity and Conservation*, 41.2, 357–364.

Lo, C., M., Jiang, J. K., Lin, C. C. (2024): Detecting microsatellite instability in colorectal cancer using Transformer-based colonoscopy image classification and retrieval. *Plos One*, 1, 19.

Macková, B. (2021): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řád trubkonosí u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Macková, B. (2023): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce. PřF UPOL, Olomouc.

Maduna, S., N., Rossouw, C., Roodt-Wilding, R., Bester-van der Merwe, A., E. (2014): Microsatellite cross-species amplification and utility in southern African elasmobranchs: A valuable resource for fisheries management and conservation. *BMC Research Notes*, 7, 352.

Mason, A., S. (2015): SSR genotyping. *Methods in molecular biology*, 1245, 77–89.

Mazloom, N. (2006): *Ciconia nigra*. Animal Diversity Web, dostupné online na: [https://animaldiversity.org/accounts/Ciconia\\_nigra/](https://animaldiversity.org/accounts/Ciconia_nigra/), navštíveno dne 24.3.2024.

Miltschev, B., Kodshabashev, N., Tschobanov, D. (2000): Zur Nahrung des Schwarzstorchs *Ciconia nigra* nach der Brutzeit in Südost-Bulgarien. *Vogelwelt*, 121, 51–53.

Modi, W. S., Romanov, M., Green, E. D., Ryder, O. (2009): Molecular Cytogenetics of the California Condor: Evolutionary and Conservation Implications. *Cytogenetic and Genome Research*, 127, 26–32.

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.

Nadir, E., Margalit, H., Gallily T., Ben-Sasson, S. A. (1996): Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 6470–6475.

Nedvědová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Nevimová, K. (2012): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Němečková, A. (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu veslonozí a plameňáci u nesyta bílého (*Mycteria cinerea*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Obručová, E. (2009): Polymorfni DNA mikrosatelity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

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.

Pigozzi M. I, Solari A. J. (2005): The germ-line-restricted chromosome in the zebra finch: recombination in females and elimination in males. *Chromosoma*, 114, 403–409.

Pojer, F. (2009): Hnízdí u nás čápi černí? *Ochrana přírody*, 4, dostupné online na: <https://www.casopis.ochranaprirody.cz/vyzkum-a-dokumentace/hnizdi-u-nas-nasi-capi-cerni/>, navštíveno dne 24. 3. 2024.

Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Møller, A. P., Ellegren, H. (1997): 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.

Saitou, N. (2013): Eukaryote Genomes. *Introduction to Evolutionary Genomics*, 17, 193–222.

- Seligmann, I. C. A., Furo, I. O., dos Santos, M. S., Tagliarini, M. M., Araujo, C. C. D., O'Brien, P. C. M., Ferguson-Smith, M. A., de Oliveira, E. H. C. (2019): Comparative Chromosome Painting in Two Brazilian Stork Species with Different Diploid Numbers. *Cytogenetic and Genome Research*, 159, 32–38.
- Senan, S., Kizhakayil, D., Sasikumar, B., Sheeja, TE (2014): Methods for development of microsatellite markers: an overview, *Notulae Scientia Biologicae*, 6, 1–13.
- Shammas, M. A. (2011): Repetitive sequences, genomic instability and Barrett's esophageal adenocarcinoma. *Mobile Genetic Elements*, 1, 208–212.
- Sharma, B. B., Banerjee, B. D., Urfi, A. J. (2017): A preliminary study of cross-amplified microsatellite loci using molted feathers from a near-threatened Painted Stork (*Mycteria leucocephala*) population of north India as a DNA source. *BMC Research Notes*, 10, 604.
- Sheldon, F. H., Slikas, B. (1997): Advances in Ciconiiformes Systematics 1976–1996. *Colonial Waterbirds* 20, 106–114.
- Shephard, J. M., Galbusera, P., Hellemans, B., Jusic, A., Akhandaf, Y. (2008): Isolation and characterization of a new suite of microsatellitemarkers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics*, 10, 1525–1528.
- 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.
- Slikas, B. (1998): Recognizing and Testing Homology of Courtship Displays in Storks (Aves: Ciconiiformes: Ciconiidae). *Society for the Study of Evolution*, 52, 884–893.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. (2017): *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. Vydavatelství MU, Brno.
- Sopko, M. (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u nesyta afrického (*Mycteria ibis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Steinkellner, H., Fluch, S., Turetschek, E., Lexer, C., Streiff, R., Kremer, A., Burg, K., Glössl, J. (1997): Identification and characterization of (GA/CT) n - microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology*, 33, 1093–1096.
- Stevens, L. (1997): Sex chromosomes and sex determining mechanisms in birds. *Science Progress*, 80, 197-216.

- Strejčková, B. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řád trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- 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.
- Sychrová, V. (2024): Čápům bílým začala sezóna. Letošní rok je navíc ve znamení velkých čapích sčítání. Česká společnost ornitologická. Dostupné online na: <https://www.birdlife.cz/capum-bilym-zacala-sezona-letosni-rok-je-navic-ve-znameni-velkych-capich-scitani/>, navštíveno dne 1. 4. 2024.
- Tarboton, W. (1982): Breeding status of the Black Stork in the Transvaal. *Ostrich*, 53, 51–156.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004) Characterization of microsatellite loci in Whitechinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes*, 4, 33–35.
- Tomasulo-Seccomandi, A. M., Schable, Bryan, A. L., Jr., Brisbin, I. L. Jr, Del Lama, S. N., Glenn, T. C. (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 563–566.
- Trent, R. J. (2012): Genes to Personalized Medicine. *Molecular medicine (Fourth Edition)*, Academic Press, 1–37.
- Van den Bussche, R. A., Harmon S. A. (1999): Low levels of genetic variability in north american populations of the Wood Stork (*Mycteria americana*). *The Auk*, 116, 1083–1092.
- Verešová, D. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- 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.

- Wang, H., Luo, X., Zhu, Q., Huang, Y., Zhou, L., Zhang, B. (2011): Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for the Oriental White stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science*, 28, 606–608.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 581–584.
- Vieira, M., L., C., Santini, L., Diniz, A., L., Munhoz, C. F. (2016): Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 312–328.
- Yamamoto, Y., Murata, K., Matsuda, H., Hosoda, T., Tamura, K., Furuyama, J. (2000): Determination of the complete nucleotide sequence and haplotypes in the D-loop region of the mitochondrial genome in the oriental white stork, *Ciconia boyciana*. *Genes & Genetic Systems*, 75, 25–32.
- Yirgu, M., Kebede, M., Feyissa, T., Lakew, B., Woldeyohannes, A. B., Fikere, M. (2023): Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for genetic diversity and population structure study in Ethiopian barley (*Hordeum vulgare L.*) germplasm. *BMC Genomic Data*, 7, 24.
- Zhang, L., Yuan, D., Yu, S., Li, Z., Cao, Y., Miao, Z., Qian, H., Tang, K. (2004): Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, 7, 1081–1086.
- 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.