

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2022**

**Ondřej Kopecký**

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



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí  
u čápa simbila (*Ciconia abdimii*)**

**Bakalářská práce**

**Ondřej Kopecký**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2022**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Ondřej KOPECKÝ  
Osobní číslo: R190220  
Studijní program: B1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa simbila (*Ciconia abdumii*)  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

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

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

&#x200b;

1. Prum, R.O. *et al.* (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
2. Dawson, D.A. *et al.* (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
3. Dawson, D.A. *et al.* (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.
4. Ahmed, S. *et al.* (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1530–1535.
5. Vianna, J.A. *et al.* (2017): Comparative genome-wide polymorphic microsatellite markers in Antarctic penguins through next generation sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, 840, 676–687.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 29. března 2021  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

L.S.



08-04-2022

---

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

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

## Bibliografické údaje

<b>Jméno a příjmení autora:</b>	Ondřej Kopecký
<b>Název práce:</b>	<i>Cross-species</i> amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa simbila ( <i>Ciconia abdimii</i> )
<b>Typ práce:</b>	Bakalářská
<b>Pracoviště:</b>	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
<b>Vedoucí práce:</b>	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce:</b>	2022

### Souhrn:

Tato bakalářská práce se soustředí na hledání polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila (*Ciconia abdimii*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace.

Teoretická část této práce se zabývá charakterizací řádu čápi, rozdíly mezi jednotlivými rody čeledě čápoovití a také popisem samotného čápa simbila. Další kapitoly jsou zaměřené na charakterizaci mikrosatelitů a na jejich popsání polymorfní lokusy u druhů z řádu trubkonosí, které byly pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovány u čápa simbila.

Experimentální část se zabývá hledáním polymorfních lokusů v genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace s použitím 213 párů mikrosatelitních primerů, z nichž 207 bylo navrženo pro zástupce z řádu trubkonosí, 5 párů pro zástupce z řádu dlouhokřídli a poslední pár pro lesňáčka žlutohého (*Dendroica petechia*) z řádu pěvců. Prostřednictvím této metody jsem našel 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů s 2–6 alelami na lokus. U zbylých 187 lokusů byl detekován monomorfní produkt.

<b>Klíčová slova:</b>	Čáp simbil, mikrosatelity, <i>cross-species</i> PCR amplifikace, <i>Ciconia abdimii</i> , trubkonosí
<b>Počet stran:</b>	61
<b>Počet příloh:</b>	0
<b>Jazyk:</b>	Český

## **Bibliographical identification**

**Author's name and surname:** Ondřej Kopecký

**Title:** Cross-species amplification of microsatellites from Procellariiformes in Abdim's Stork (*Ciconia abdimii*)

**Type of thesis:** Bachelor

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

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

**The year of presentation:** 2022

### **Summary:**

This bachelor thesis focuses on the search for polymorphic microsatellite loci in Abdim's Stork (*Ciconia abdimii*) using cross-species PCR amplification.

The theoretical part of this thesis deals with the characterization of the order Ciconiiformes, the differences between the genera of the family Ciconiidae and also with description of the Abdim's stork. The next chapters are focused on the characterization of microsatellites and description of their polymorphic loci in species of the order Procellariiformes, which were tested in the Abdim's stork by cross-species PCR amplification.

The experimental part deals with the search for polymorphic loci in the genomic DNA of 6 unrelated Abdim's stork individuals by using the cross-species PCR amplification method with 213 pairs of microsatellite primers, 207 pairs of which were designed for species of the order Procellariiformes, 5 for species of the order Charadriiformes and last pair for Mangrove Warbler (*Dendroica petechia*) from the order Passeriformes. By using this method I found 26 polymorphic microsatellite loci with 2 to 6 alleles per locus. A monomorphic product was detected in the remaining 187 loci.

**Keywords:** Abdim's Stork, microsatellites, cross-species PCR amplification, *Ciconia abdimii*, Procellariiformes

**Number of pages:** 61

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

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

V Olomouci dne 6. 5. 2022

.....

Mé poděkování patří vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Petru Nádvoříkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, čas, ochotu, vstřícnost, poskytnuté materiály a veškerou pomoc při zpracování teoretické i experimentální části této práce. Dále bych chtěl poděkovat kolegyním z Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za výbornou atmosféru v laboratoři při zpracovávání experimentální části.



## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled</b> .....	<b>3</b>
3.1	Řád čápi .....	3
3.2	Čeď čápovití .....	4
3.3	Čáp simbil .....	7
3.4	Mikrosatelity .....	8
3.5	Mikrosatelitní lokusy charakterizované u druhů z řádu trubkonosí .....	10
3.5.1	Mikrosatelitní lokusy charakterizované u druhů z čeledi albatrosovití ....	11
3.5.2	Mikrosatelitní lokusy charakterizované u druhů z čeledi buňňáčkovití ....	13
3.5.3	Mikrosatelitní lokusy charakterizované u druhů z čeledi buňňákovití .....	14
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>18</b>
4.1	Biologický materiál .....	18
4.2	Seznam použitých chemikálií .....	18
4.3	Seznam použitých roztoků a jejich příprava .....	19
4.4	Seznam použitých laboratorních přístrojů .....	21
4.5	PCR amplifikace DNA čápa simbila .....	21
4.6	Amplifikované mikrosatelitní lokusy u čápa simbila .....	22
4.7	Elektroforetická separace PCR produktů .....	25
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>Diskuse</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>47</b>

## Seznam obrázků

<b>Obrázek č. 1:</b> Zařazení řádu Ciconiiformes mezi příbuzné řády vodních ptáků dle Winkler <i>et al.</i> (2015). .....	3
<b>Obrázek č. 2:</b> Rozdělení druhů v čeledi čápovití podle Sheldon <i>et Slikas</i> (1997) a Slikas (1997, 1998). .....	5
<b>Obrázek č. 3:</b> Rozdělení 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů detekovaných u čápa simbila vzhledem k druhům, u nichž byly izolovány. ....	33
<b>Obrázek č. 4:</b> Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Omn8 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. ....	36
<b>Obrázek č. 5:</b> Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Puff G2C testovaného u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. ....	37
<b>Obrázek č. 6:</b> Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Ptero09 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. ....	37
<b>Obrázek č. 7:</b> Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Pc D103 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. ....	37
<b>Obrázek č. 8:</b> Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Pacbel_19907 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. ....	37

## Seznam tabulek

<b>Tabulka č. 1:</b> Složení PCR směsi pro 6 vzorků .....	22
<b>Tabulka č. 2:</b> Teplotní a časový profil PCR reakce .....	22
<b>Tabulka č. 3:</b> Testované mikrosatelitní lokusy popsané u druhů z čeledi albatrosovití.	23
<b>Tabulka č. 4:</b> Testované mikrosatelitní lokusy popsané u druhů z čeledi buňňáčkovití. .....	23
<b>Tabulka č. 5:</b> Testované mikrosatelitní lokusy popsané u druhů z čeledi buňňákovití.	24
<b>Tabulka č. 6:</b> Testované mikrosatelitní lokusy popsané u druhů z řádu dlouhokřídli a pěvcí .....	25
<b>Tabulka č. 7:</b> Charakteristika 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly testovány na 6 nepříbuzných jedincích čápa simbila .....	30
<b>Tabulka č. 8:</b> Genotypy 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila pro u nich nalezených 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů .....	34
<b>Tabulka č. 9:</b> Porovnání mnou testovaných teplot <i>annealingu</i> a detekovaného počtu alel pro nalezené polymorfní mikrosatelitní lokusy u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila s publikacemi .....	39
<b>Tabulka č. 10:</b> Srovnání polymorfních mikrosatelitních lokusů z řádu trubkonosí, které byly pomocí <i>cross-species</i> PCR amplifikace testovány u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila (tato práce) a současně byly polymorfní u nesyta indomalajského (Nedvědová, 2015), plameňáka karibského (Strejčková, 2018), pelikána skvrnozobého (Macková, 2021), plameňáka růžového (Zlochová, 2019), pelikána bílého (Adámková, 2021), pelikána afrického (Kopečná, 2020), čápa bílého (Krňávková, 2021), čápa černého (Musilová, nezveřejněná data), potápky roháče (Janušová, 2017) a pelikána kadeřavého (Verešová, 2020).....	43

# 1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké sekvence DNA tandemově opakujících se repetice o délce 1–6 párů bází a vyskytují se v eukaryotních i prokaryotních genomech. Mezi jejich specifické vlastnosti lze zařadit to, že jsou kodominantní, multialelické, vysoce polymorfní a rychleji mutují než zbytek genomu. Díky těmto vlastnostem jsou využívány jako genetické markery např. při zkoumání populační struktury, testování paternity nebo forenzní analýze. Velikou nevýhodou mikrosatelitů je jejich dlouhé a nákladné hledání, proto se využívá *cross-species* PCR amplifikace. Tato metoda umožňuje využít primery navržené pro PCR amplifikaci daného mikrosatelitního lokusu izolovaného od zdrojového druhu k amplifikaci stejného lokusu u fylogeneticky blízkých příbuzných druhů.

Čáp simbil (*Ciconia abdimii*) je zástupce řádu čápi (Ciconiiformes) v Africe, kde je velmi početně rozšířen. V rámci Laboratoře Populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci byly již pro tento druh v několika pracích hledány polymorfní mikrosatelitní lokusy a moje práce by měla navázat na předešlé práce. Cílem této bakalářské práce bude nalezení polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly dříve popsány u druhů z řádu trubkonosí, u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila.

## 2 Cíle práce

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

### 3 Literární přehled

#### 3.1 Řád čápi

Řád Ciconiiformes byl dříve nazýván řádem brodiví a zahrnoval čeledi volavkovití (Ardeidae), čápoovití (Ciconiidae), ibisovití (Threskiornithidae), kladivoušovití (Scopidae) a člunozobcovití (Balaenicipitidae). V posledních deseti letech pomocí nových studií, které se zakládají na molekulárních analýzách, byl pohled na tento řád změněn. V novém pojetí je řád Ciconiiformes monofyletický (Obrázek č. 1) (Slikas, 1997; Prum *et al.*, 2015; Winkler *et al.*, 2015) a je označován česky jako řád čápi (Hudec *et al.*, 2016; Gaisler *et Zima*, 2018). Tento řád nově obsahuje jedinou čeleď čápoovití (Ciconiidae), která se dělí na 3 triby a ty celkem zahrnují v 6 rodech 19 druhů (Gill *et Donsker*, 2022). S tímto novým pojetím bude dále pracováno v této práci a řád Ciconiiformes bude označován jako řád čápi.



**Obrázek č. 1:** Zařazení řádu Ciconiiformes mezi příbuzné řády vodních ptáků dle Winkler *et al.* (2015).

Řád čápi zahrnuje středně až velmi velké druhy ptáků, kteří jsou přizpůsobeni získávat potravu z vody nebo bažinatých biotopů (Gaisler *et Zima*, 2018). Největší zástupci mohou měřit na délku (tzn. od špičky zobáku po konec ocasu) až 152 cm a vážit 8,9 kg (samec čápa marabu), zatímco nejmenší mohou měřit na délku 75 cm a vážit 1,3 kg (čáp simbil). Zpravidla je samec větší než samice. Mezi charakteristické znaky tohoto řádu patří dlouhý přímý a klínovitý zobák, který je adaptován pro lov různých vodních živočichů a u jednotlivých rodů se může jeho tvar lišit (del Hoyo *et al.*, 1992; Hudec *et al.*, 2016).

Mezi další znaky řádu čápi patří protáhlý krk a dlouhé brodivé nohy, které umožňují dlouhý krok a tím rychleji překonávat terén a brodit se i v hlubších vodách

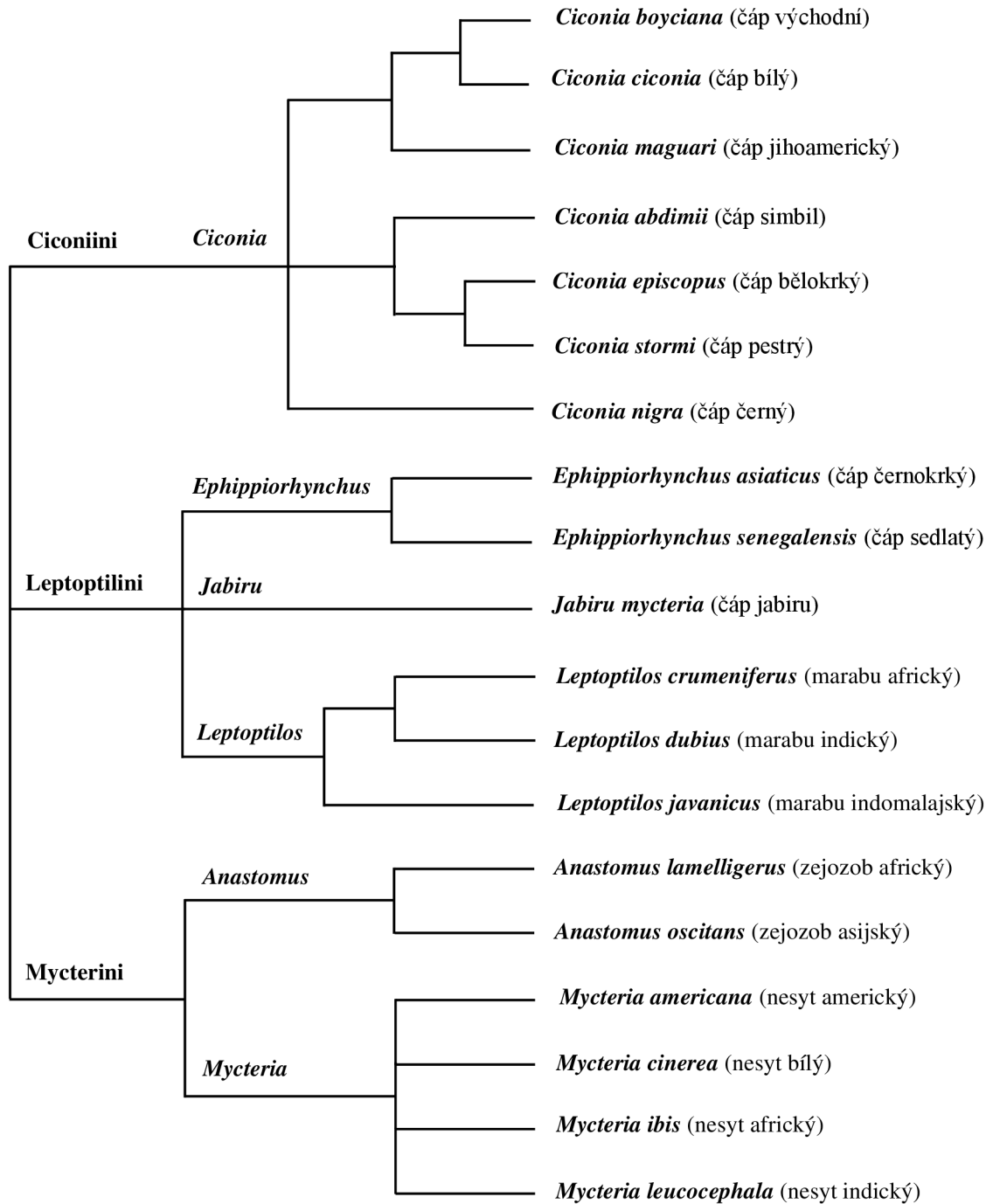
(del Hoyo *et al.*, 1992). Nohy jsou značně protáhlé především v běháku a bérce. Více než polovina bérce nad patou je neopeřená. Na dolní končetině mají dlouhé a ohebné prsty, nízko nasazený a málo vyvinutý palec (Hudec *et al.*, 2016; Gaisler *et Zima*, 2018). *Tarsus* je šupinatý (del Hoyo *et al.*, 1992). Neumějí rychle běhat, pohybují se pomalým krokem a jakmile prchají, vzlétnou. Čápi mají dlouhá, široká křídla, která jsou výborně uzpůsobena k vzletnutí. Při letu mají nohy vždy natažené, krk drží natažený dopředu a dovedou dokonale plachtit. Na rozdíl od pelikánů čápi nelétají v pravidelných formacích při krátkých přesunech ani při migraci. Výjimkou jsou čápi jihoameričtí (*Ciconia maguari*) v Brazílii, kteří pravidelně létají v klínových formacích (del Hoyo *et al.*, 1992; Hudec *et al.*, 2016). Kostra je pneumatizovaná a lehká. Mají obvykle malý jazyk, jícen bez volete, třídlílný žaludek s dobře vyvinutým pylorickým oddílem. Slepá střeva jsou malá a zakrnělá, samci mají rudimentární penis. Hlasové ústrojí je zakrnělé, chybí většinou hlasové svaly, proto tento nedostatek čápi nahrazují vytvářením mechanických zvuků, tj. klapáním zobákem (Hudec *et al.*, 2016; Gaisler *et Zima*, 2018).

Zástupci řádu čápi obývají otevřené i lesní krajiny poblíž vnitrozemských vod, výjimkou jsou marabuové, kteří žijí v suchém prostředí. Patří mezi masožravce, ale jen výjimečně jsou mrchožraví, pouze marabuové jsou schopni požírat mršiny díky mohutnému zobáku. Čápi žijí v monogamii, občas vytvářejí menší hnízdní kolonie (Hudec *et al.*, 2016). Stavějí většinou velká hnízda na stromech nebo v rákosinách z větví a klacků. Vejce jsou matná. Mláďata se líhnou nidikolní, vidoucí a starají se o ně oba rodiče. Čápi vyskytující se v severních oblastech patří mezi stěhovavé a v zimě migrují do oblastí tropického pásu jako např. čáp bílý, táhnoucí z Evropy až do jižní Afriky (Hudec *et al.*, 2016; Gaisler *et Zima*, 2018).

### 3.2 Čeleď čápovití

Čeleď čápovití (Ciconiidae) je velmi dobře definovanou skupinou a její charakteristické rysy se již objevovaly na počátku třetihor. Nejstarší fosilie, které lze identifikovat jako čápovité, pocházejí ze svrchního eocénu ve Francii. Z rozsáhlých paleontologických nálezů, které čítaly přibližně 30 druhů, lze usoudit, že hlavní radiace této čeledi proběhla v oligocénu. Dnešní rody, jako jsou *Ciconia*, *Ephippiorhynchus* a *Leptoptilos*, se vyskytovaly již v miocénu, zatímco z recentních druhů, jako je nesyt americký (*Mycteria americana*) nebo čáp jabiru (*Jabiru mycteria*), byly nalezeny pozůstatky až v pozdních pleistocénních usazeninách, které se ukládaly asi před 140 000 lety (del Hoyo *et al.*, 1992).

Kahl (1971, 1979) po svých pracích, které byly založeny na srovnávání projevů a chování jednotlivých druhů, rozdělil tuto čeleď do 3 tribů (Ciconiini, Leptoptilini a Mycterini), které zahrnují celkem 19 druhů v 6 rodech. Zařazením jednotlivých rodů a druhů do čeledi čápoovití se také zabývali ve svých pracích Sheldon *et* Slikas (1997) i sám Slikas (1997, 1998). Jimi navržené rozdělení čeledi čápoovití je na Obrázku č. 2.



**Obrázek č. 2:** Rozdělení druhů v čeledi čápoovití podle Sheldon *et* Slikas (1997) a Slikas (1997, 1998).



První tribus zahrnuje pouze rod *Ciconia* se 7 druhy, kam se řadí *C. abdimii* (čáp simbil), *C. boyciana* (čáp východní), *C. ciconia* (čáp bílý), *C. episcopus* (čáp bělokrký), *C. maguari* (čáp jihoamerický), *C. nigra* (čáp černý) a *C. stormi* (čáp pestrý) (Gill *et* Donsker, 2022). Do tohoto rodu patří středně velcí až velcí čápi, převážně černobíle opeření, létají s nataženým krkem, jsou velmi společenští a migrují v hejnech (Brown *et al.*, 1993).

Do druhého tribu patří 3 rody obsahující celkově 6 druhů. První rod je *Ephippiorhynchus* zahrnující 2 druhy - *E. asiaticus* (čáp černokrký), žijící v Asii až po Austrálii, a *E. senegalensis* (čáp sedlatý), který obývá území Afriky (Gill *et* Donsker, 2022). Tento rod zahrnuje velmi velké, štíhlé čápy s černobílým opeřením, zobák je dlouhý, štíhlý a bočně stlačený (Brown *et al.*, 1993). Druhým rodem je rod *Jabiru* pouze s jedním druhem *J. mycteria* (čáp jabiru), zařazující se mezi velké čápy a žijící od Mexika přes Střední Ameriku a severní část Jižní Ameriky po severní Argentinu a Uruguay (del Hoyo *et al.*, 1992). Posledním rodem patřícím do toho tribu je rod *Leptoptilos* obsahující 3 druhy - *L. crumeniferus* (marabu africký), *L. dubius* (marabu indický) a *L. javanicus* (marabu indomalajský) (Gill *et* Donsker, 2022). Do tohoto rodu se řadí velmi velcí až obrovští ptáci, kteří mohou působit na zemi těžkopádně až nemotorně. Od všech ostatních rodů z čeledi čápoovití se odlišují téměř holou hlavou a krkem, někdy pestře zbarvenými; dlouhým, silným a kuželovitým zobákem; roztažitelnými vzdušnými vaky na hrdle a horní části hřbetu; chocholkou peří na bázi krku obklopující hřbetní vzdušný vak; specializovanými načechranými ocasními pery. Také se narozdíl od ostatních rodů této čeledi dokážou živit mršinami (Brown *et al.*, 1993).

Třetí a zároveň poslední tribus je členěn na 2 rody, které se dále celkově dělí na 6 druhů. Prvním rodem je rod *Anastomus* zahrnující 2 druhy - *A. lamelligerus* (zejzob africký) a *A. oscitans* (zejzob asijský) (Gill *et* Donsker, 2022). Tento rod zahrnuje středně velké čápy s vysoce specializovaným zobákem, kde spodní a horní čelist dospělého jedince jsou odděleny mezerou a dotýkají se pouze ve špičce. Tato specializace napomáhá lovit měkkýše bez ulit (Brown *et al.*, 1993). Druhým rodem je rod *Mycteria*, který je členěn do 4 druhů, kam se řadí *M. americana* (nesyt americký), *M. cinerea* (nesyt bílý), *M. ibis* (nesyt africký) a *M. leucocephala* (nesyt indický) (Gill *et* Donsker, 2022). Do tohoto rodu patří středně velcí čápi s holou hlavou nebo obličejem. Opeření je většinou bílé s červenými nebo růžovými a černými křídly. Mezi rodové specifické znaky

se řadí vysoce specializovaný zobák se zduřelou bází, který je na průřezu kulatější než u ostatních čápů a je výrazně zahnutý na špičce směrem dolů. Klapání zobáku se vyskytuje méně častěji než u ostatních rodů z čeledi čápoovití (Kahl, 1972).

### 3.3 Čáp simbil

Systematické zařazení čápa simbila dle Gill *et* Donsker (2022) je následující:

Říše:	Animalia (živočichové)
Kmen:	Chordata (strunatci)
Podkmen:	Vertebrata (obratlovci)
Třída:	Aves (ptáci)
Podtřída:	Neognathae (letci)
Řád:	Ciconiiformes (čápi)
Čeleď:	Ciconiidae (čápoovití)
Rod:	<i>Ciconia</i> (čáp)
Druh:	<i>Ciconia abdimii</i> (čáp simbil)

Čáp simbil je nejmenší druh z rodu čáp, který žije pouze v Africe (del Hoyo *et al.*, 1992). Patří mezi tropické transekvatoriální migranty, kteří hnízdí od Somálska, Etiopie, Ugandy a severozápadní Keni až po Senegal. V mimohnízdním období upřednostňuje migraci hlavně na východ a jih, k povodí Zambezi a na území Transvaalu. Čáp simbil se vyskytuje v Africe velmi hojně a žije ve velmi početných hejnech. Druh je s vysokou pravděpodobností početně stabilní a není zařazen na seznam ohrožených druhů (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993).

Délka těla dospělých jedinců dosahuje 75–80 cm a hmotnost až 1,3 kg. Samec je větší než samice (del Hoyo *et al.*, 1992). Hlava, krk, hřbet a horní část křídel jsou zbarveny do černa s fialovým a zeleným odleskem. Naopak břicho, náprsenka, spodní strany ocasních per a křídel jsou bílé. Zobák je světle zelený s červenou špičkou, báze zobáku modrá. Šedomodrá holá kůže na obličejí, pod očima a pod zobákem je zbarvena červeně. Od čápa černého se liší bílou zadní částí hřbetu a horní částí ocasních per, zeleným zobákem a nohama s červeným podvazem na tibio-tarzálním kloubu. Nedospělí jedinci bývají bez skvrn, hnědší a méně lesklí než dospělí jedinci; zobák a nohy mívají tmavší a méně lesklé. Mláďata jsou po vylíhnutí světle šedá nebo bělavá. Jedinci tohoto

druhu jsou obvykle velmi tiší, s výjimkou hnízdních lokalit, kde vydávají slabé hvízdání znějící jako „heep-heep“, po němž následuje klapání zobákem naměřeným k nebi (Brown *et al.*, 1993). Živí se především kobyčkami, sarančaty, cvrčky, ale také například malými vodními živočichy nebo zřídka myšmi (del Hoyo *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993).

Čáp simbil se vyskytuje především na otevřených travnatých plochách, ale také v kulturních oblastech; často v blízkosti vody, ale i ve velmi suchých lokalitách včetně polopouští. Hnízdí na stromech a skalách, ale také se může vyskytovat v oblasti bažin a tůní (del Hoyo *et al.*, 1992). Mnohdy hnízdí ve spojení s člověkem ve vesnicích afrických kmenů, které ho uctívají a vítají ho jako předzvěst dešťů. Hnízdo může mít v průměru až 1,5 m, bývá složeno z velkých klacků, trávy a listů (Brown *et al.*, 1993). V období mezi květnem až srpnem hnízdí severně od rovníku, v období mezi listopadem až březnem hnízdí v jižních tropech. Migruje ve velkých hejnech, která mohou čítat až 10 000 jedinců (del Hoyo *et al.*, 1992). Klazení vajec nejčastěji probíhá v lednu a březnu v západní Keni; v hlavních částech areálu obvykle v květnu při vrcholících ranních deštích. Snáší zpravidla 2–3 vejce, která jsou křídově bílá, vnitřní strana skořápky může na světle vytvářet zelené odlesky. Obě pohlaví sedí na vejcích. Mláďata jsou prvních 15 dnů od vylíhnutí úplně nahá a dokážou vzlétnout až po 50–60 dnech. Celý cyklus od stavby hnízda až po vylétnutí mláďat trvá cca 90–100 dní (Brown *et al.*, 1993).

### 3.4 Mikrosatelity

Mikrosatelity, označovány také jako krátké tandemové repetice (STR) nebo jednoduché opakované sekvence (SSRs), jsou krátké repetitivní sekvence DNA, ve kterých se opakuje specifický motiv 1–6 párů bází (Goldstein *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2006) a celková délka repetice nepřesahuje 100 párů bází (Tautz, 1989). Objevují se u eukaryotních organismů, ale také se mohou vyskytovat v prokaryotních genomech, kde v některých případech ovlivňují patogenitu (Oliveira *et al.*, 2006). Mikrosatelitní lokusy se vyznačují tím, že jsou kodominantní, multialelické, mutují rychleji než zbytek genomu (Jarne *et al.*, 1996), a to asi přibližně  $10^{-2}$ – $10^{-6}$  nukleotidů na jeden lokus na jednu generaci (Sia *et al.*, 2000), a jejich heterozygotnost se pohybuje nad 60 % (Goldstein *et al.*, 1997), dokonce se může blížit až k 90 % (Ellegren, 1992). Díky těmto vlastnostem se využívají jako genetické markery poskytující například informace pro analýzu konzervovaných sekvencí nebo pro zjištění genetických procesů, které probíhají v populacích, jako je například genetický tok a genetický drift

(Oliveira *et al.*, 2006). Mikrosatelitní markery mohou také najít uplatnění při testování paternity, forenzní analýze nebo k odvozování demografických procesů (Ellegren, 2004).

Mikrosatelity se dají rozdělit podle struktury opakované sekvence na dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené. V dokonalém mikrosatelitu není repetitivní sekvence přerušena jinou bází, která se odlišuje od opakujícího se motivu (např. GTGTGTGTGTGTGT), oproti tomu v nedokonalém mikrosatelitu se objevuje mezi repetitivními sekvencemi pár bází, který běžně nepatří do daného opakovaného motivu (např. GTGTGTAGTGTGT). Mikrosatelit obsahující jinou sekvenci, která neodpovídá sekvenci repetitivního motivu (např. GTGTGTAGCTAGGTGTGT), se označuje jako přerušovaný, zatímco složený mikrosatelit zahrnuje ve své sekvenci dva různé sousedící opakující se motivy (např. GTGTGTGTGTACACACACAC) (Oliveira *et al.*, 2006).

Mikrosatelity se také dají rozdělit podle délky samotného repetitivního motivu na mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa- a vícenukleotidové sekvence, kdy se nejčastěji objevují mikrosatelity o délce opakujícího se motivu 1–4 bp (Tóth *et al.*, 2000). Velká část jednoduchých repetit se vyskytuje v nekódující DNA, a to buď v intronech nebo v intergenních sekvencích (Ellegren, 2004). V těchto oblastech dominují mono-, di- a tetranukleotidové repetice. Naopak v exonech se vyskytují nejčastěji trinukleotidové sekvence a jako druhé nejčastější se objevují hexanukleotidové sekvence. Pentanukleotidové repetice jsou většinou málo zastoupené v exonech, ale jejich četnost je srovnatelná s četností trinukleotidových repetit v intronech a intergenních oblastech s výjimkou savčích genomů (Tóth *et al.*, 2000). S rostoucí velikostí genomu se počet mikrosatelitů zvyšuje. V eukaryotických genomech se vyskytuje nejvíce mikrosatelitů u savců, naopak v rostlinných genomech počet mikrosatelitů klesá s rostoucí velikostí genomu (Ellegren, 2004).

Vznik mikrosatelitních lokusů je stále předmětem zkoumání. Dříve se uvažovalo, že by mohly vznikat pomocí rekombinačních procesů, do kterých se řadí nerovnoměrný crossing-over nebo genová konverze. Zjistilo se ale, že tyto procesy zavádějí mutace do větších sekvencí, jako jsou například minisatelity (Ellegren, 2004). V dnešní době je předpokládáno, že mikrosatelity vznikají procesem, který bývá označen jako „sklouznutí DNA“, „sklouznutí polymerázy“ nebo „chybné spárování sklouznutého vlákna“. Při tomto procesu sklouznutí dochází v komplexu proteinů, který zprostředkovává replikaci DNA, v důsledku chybného párování o jednu nebo více repetitivních jednotek mezi

templátovým a nově syntetizovaným vláknem DNA. Vzniklá nespárovaná oblast DNA vytvoří na vlákně „smyčku“. Pokud se tato smyčka nachází na nově vzniklém vlákně, výsledkem je přidání jednotky repetice. Pokud se nachází tato „smyčka“ na templátovém vlákně, tak poté je odstraněna enzymy a konečným výsledkem je ztráta jedné repetice na tomto vlákně (Bennett, 2000). Z kvantitativních experimentů vyplývá, že rychlost sklouznutí polymerázy se zvyšuje s rostoucím počtem opakujících se jednotek a zmenšující se délkou repetitivního motivu (Ellegren, 2004). Jedinec homozygotní pro daný mikrosatelitní lokus má stejný počet repetic na obou homologních chromozomech, zatímco jedinec heterozygotní pro tento lokus má rozdílný počet opakujících se motivů pro každou alelu (Sia *et al.*, 2000).

Výzkum nových druhově specifických nebo univerzálních mikrosatelitních primerů je velmi finančně nákladný a časově náročný, avšak v mnoha vědeckých pracích se ukázalo, že páry primerů navržené pro specifický druh se dají využít pro druhy stejného rodu, dokonce i pro různé rody stejných čeledí. Tato metoda se nazývá *cross-species* PCR amplifikace. Mikrosatelitní přenositelnost mezi příbuznými druhy je zajištěna homologní povahou sekvence DNA obklopující mikrosatelit (Oliveira *et al.*, 2006). Barbará *et al.* (2007) hledali rozdíly v přenositelnosti mikrosatelitních lokusů u zástupců ze tří říší - z hub, rostlin a živočichů a zjistili, že přenositelnost je nejvyšší u živočichů, ale u rostlin se přenositelnost značně liší mezi jednotlivými druhy. Přišli také na to, že nejúspěšnější *cross-species* PCR amplifikace probíhá u druhů s dlouhou generační dobou, kdy nedochází k příbuzenskému křížení. Galbusera *et al.* (2000) ve své práci pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovali 40 párů mikrosatelitních primerů u 13 druhů z řádu pěvců a stanovili hypotézu, že úspěšnost amplifikace a polymorfismu klesá se zvětšující se fylogenetickou vzdáleností mezi zdrojovým a testovaným druhem. Tuto hypotézu potvrdili Primmer *et al.* (2005). Metoda *cross-species* PCR amplifikace se především uplatňuje při analýze paternity u ptáků (Dawson *et al.*, 1997), jelikož ptačí genom obsahuje asi 10krát méně mikrosatelitních lokusů než například lidský (Primmer *et al.*, 1997; Neff *et al.*, 2001). Z tohoto důvodu by bylo finančně i časově náročné vyvinout pro každý studovaný druh nové druhově specifické mikrosatelitní primery (Piertney *et al.*, 1998; Ishibashi *et al.*, 2000).

### **3.5 Mikrosatelitní lokusy charakterizované u druhů z řádu trubkonosí**

Řád trubkonosí (Procellariiformes) je členěn na 4 čeledi, a to na albatrosovité (Diomedidae), buňňáčkovité (Hydrobatidae), buňňákovité (Procellariidae) a buňňíkovité

(Pelecanoididae), které dohromady zahrnují přibližně 125 druhů (Gaisler *et* Zima, 2018). Laboratoř populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci má k dispozici celkově 207 párů primerů pro mikrosatelitní lokusy, které již byly popsány u tří čeledí z řádu trubkonosí. Laboratoř také disponuje 6 páry mikrosatelitních primerů, které byly dříve navrženy pro mikrosatelitní lokusy popsanych u zástupců z jiných řádů ptáků a byly současně úspěšně testovány jako *cross-species* u zástupců z řádu trubkonosí. 5 párů z těchto primerů pochází od zástupců z řádů dlouhokřídlí (Charadriiformes), a to od alkouna holubího (*Cephus columba*), kulíka mořského (*Charadrius alexandrinus*) a racka novozélandského (*Chroicocephalus novaehollandiae scopulinus*). Zbývající pár primerů pochází od lesňáčka žlutohého (*Dendroica petechia*), který je součástí řádu pěvci.

### **3.5.1 Mikrosatelitní lokusy charakterizované u druhů z čeledi albatrosovití**

Laboratoř populační genetiky má k dispozici z čeledi albatrosovití 53 párů mikrosatelitních primerů, které byly popsány v 5 publikacích u 7 druhů z celkově 3 rodů, a to u albatrosa jižního (*Diomedea antipodensis gibsoni*), stěhovavého (*D. exulans*), šedohlavého (*Thalassarche chrysostoma*), černobrvého (*T. melanophris*), bělohřbetého (*Phoebastria albatrus*), laysanského (*P. immutabilis*) a černonohého (*P. nigripes*).

Burg (1999) vyizolovala a popsala 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů, a to D6, D24, D29, D32, Dc5, Dc9, Dc10, Dc16, Dc19, Dc20, Dc21, Dc22, Dc26, Dc27, Dc31, De1, De2, De3, De7, De11, De12, De17, De18, De25, De30 a De33, u dvou druhů - u albatrosa šedohlavého a albatrosa stěhovavého. Vždy z jednoho jedince od každého druhu byla vyizolována genomická DNA. Z ní byly poté vytvořeny pro každý druh dvě genomové knihovny (celkově tedy 4), kdy jedna z nich byla vždy obohacena o AC a CTTT repeticí pomocí protokolu založeného na hybridizaci dle Armour *et al.* (1994). Bylo navrženo 31 párů mikrosatelitních primerů, ale pouze 26 párů primerů vytvořilo viditelný PCR produkt a ty byly dále testovány *cross-species* PCR amplifikací na genomové DNA z 50 jedinců albatrosa černobrvého, 90 jedinců albatrosa stěhovavého a 50 jedinců albatrosa šedohlavého. 21 mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních a jejich počet alel se pohyboval v rozmezí 2–11. U albatrosa stěhovavého nedošlo k PCR amplifikaci lokusů Dc10 a Dc19, ale u zbývajících dvou druhů byly tyto lokusy úspěšně amplifikovány.

Burg *et* Croxal (2001) se zabývali strukturou populace albatrosů černobrvých a šedohlavých a k tomu využili analýzu mitochondriální DNA a mikrosatelitních lokusů. Bylo použito 6 lokusů již popsanych v práci Burg (1999) a 1 nový lokus - De35. Tento nově popsany lokus vykazoval polymorfismus a u albatrosa černobrvého (660 jedinců) bylo detekováno 7–12 alel a u albatrosa šedohlavého (699 jedinců) 8–22 alel.

Burg *et* Croxall (2004) zkoumali populační a fylogenetické struktury, aby objasnili taxonomické zařazení 2 druhů - albatrosa jižního a stěhovavého. Byla testována genomická DNA celkově 772 jedinců a k analýze bylo využito 9 mikrosatelitních lokusů, 8 z nich již bylo charakterizováno ve studii Burg (1999) a jeden byl nově popsany - De37. Tento nově popsany lokus byl obou druhů polymorfní, a to se 7 alelami u albatrosa jižního a 6 alelami u albatrosa stěhovavého.

Dubois *et al.* (2005) charakterizovali u albatrosa stěhovavého 10 nových polymorfních mikrosatelitních lokusů, a to 6A3, 6F12, 7D8, 10C5, 11F3, 11H1, 11H7, 12C8, 12E1 a 12H8. K analýze byla využita genomická DNA ze 3 populací albatrosa stěhovavého a vždy bylo vybráno z každé populace 20 jedinců. Míra polymorfismu u těchto nových mikrosatelitních lokusů byla detekována v rozmezí 2–13 alel. Páry primerů navržené pro tyto polymorfní lokusy byly použity při *cross-species* PCR amplifikaci u buňáka Bulwerova, sněžného a šedého. U buňáka šedého nebyla nalezena žádná variabilita, u zbylých dvou druhů se vyskytoval polymorfismus. Autoři neuvádějí u těchto polymorfních lokusů počty alel.

Hernandez *et al.* (2014) popsali 15 polymorfních mikrosatelitních lokusů u tří druhů, a to 6 lokusů (STAL4, STAL8, STAL12, STAL18, STAL20 a STAL24) u albatrosa bělohřbetého, 5 lokusů (BFAL4, BFAL11, BFAL14, BFAL19 a BFAL20) u albatrosa černonohého a 4 lokusy (LAAL1, LAAL7, LAAL10 a LAAL19) u albatrosa laysanského. Genomická DNA byla vyizolována ze svalové tkáně ze 3 jedinců albatrosa bělohřbetého, 36 jedinců albatrosa černonohého a 12 jedinců albatrosa laysanského. Poté z ní byly sestaveny genomové knihovny pro jednoho jedince z každého druhu (tj. celkem 3 knihovny). Bylo testováno 16 párů navržených mikrosatelitních primerů, ale pouze 13 z nich vykazovalo variabilitu. U albatrosa bělohřbetého bylo detekováno 2 až 7 alel, u albatrosa černonohého a laysanského 2 až 18 alel.

### 3.5.2 Mikrosatelitní lokusy charakterizované u druhů z čeledi buřňáčkovití

Laboratoř populační genetiky také disponuje mikrosatelitními primery z čeledi buřňáčkovití, a to celkem 54 páry. Tyto mikrosatelitní primery byly popsány ve 3 publikacích celkem u 3 druhů, a to u buřňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*), dlouhokřídleho (*O. leucorhoa*) a Monteirova (*O. monteiroi*).

Sun *et al.* (2009) charakterizovali 10 polymorfních mikrosatelitních lokusů. U buřňáčka madeirského popsali celkem 9 lokusů (Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84 a Oc87B) a u buřňáčka dlouhokřídleho pouze 1 lokus (Ol10-39). Genomická DNA buřňáčka madeirského byla vyizolována ze zamražené krve 7 jedinců a poté z ní byla vytvořena knihovna obohacená o repetice. Také byla vytvořena genomová knihovna z genomické DNA vyizolované ze zamražené krve 2 jedinců buřňáčka dlouhokřídleho. Navržené páry primerů pro zmíněné mikrosatelitní lokusy byly otestovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 24 jedinců buřňáčka dlouhokřídleho, 27 jedinců buřňáčka madeirského a u 22 jedinců buřňáčka Monteirova. U každého druhu bylo detekováno minimálně 6 polymorfních lokusů s 2–11 alelami.

Bicknell *et al.* (2011) se zabývali hledáním polymorfních mikrosatelitních lokusů u buřňáčka dlouhokřídleho a celkově jich objevili 26 (Ole1 až Ole26). 24 nepříbuzným jedincům byla odebrána krev a z ní vyizolována genomická DNA, ze které byla poté vytvořena genomová knihovna obohacená o dinukleotidové a tetranukleotidové repetice. Bylo nalezeno celkově 211 nových mikrosatelitních lokusů, pouze pro 50 lokusů byly pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) navrženy páry primerů a ty byly otestovány na 4–6 jedincích buřňáčka dlouhokřídleho. Z 50 lokusů se 6 nepodařilo amplifikovat, 18 lokusů se jevilo jako monomorfní a bylo detekováno celkem 26 polymorfních lokusů. Páry primerů pro tyto polymorfní lokusy byly dále testovány na 24 nepříbuzných jedincích, u kterých se pozorovalo až 22 alel na lokus. Také bylo zjištěno, že mikrosatelitní lokusy Ole12, Ole 16, Ole26 a Ol10-39 jsou vázané na chromozomu Z.

Bried *et al.* (2012) zkoumali mikrosatelitní lokusy u buřňáčka Monteirova a popsali u něj 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Omn1, Omn2, Omn3, Omn4, Omn6, Omn7, Omn8, Omn11, Omn14, Omn15, Omn16, Omn17, Omn21, Omn22, Omn23, Omn24, Omn25 a Omn28). Bylo izolováno 27 mikrosatelitních lokusů z obohacených knihoven, které poté prošly pyrosekvenováním podle Malusa *et al.* (2011), ale z důvodu neúspěšné amplifikace nebo nedostatečné heterozygotnosti bylo dále



testováno 18 lokusů na 125 jedincích buňňáčka Monteirova. Úroveň polymorfismu u těchto 18 lokusů byla 4–17 alel. Lokus Omn23 byl označen jako pohlavně vázaný, protože žádná samice nebyla pro tento lokus heterozygotní.

### 3.5.3 Mikrosatelitní lokusy charakterizované u druhů z čeledi buňňákovití

Laboratoř populační genetiky má k dispozici z čeledi buňňákovití 100 párů mikrosatelitních primerů, které byly popsány v deseti článcích u 9 druhů, a to u buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), šedého (*Calonectris diomedea*), taiko (*Pterodroma magentae*), trinidadského (*P. arminjoniana*), havajského (*P. sandwichensis*), Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), útlozobého (*Pachyptyla belcheri*), baleárského (*Puffinus mauretanicus*) a světlenohého (*P. carneipes*).

Techow *et* O’Ryan (2004) charakterizovali 7 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Paequ2, Paequ3, Paequ4, Paequ7, Paequ8, Paequ10 a Paequ13) u buňňáka bělobradého. Pomocí genomické DNA byla sestavena genomová knihovna obohacená o opakující se dinukleotidové sekvence (CA)<sub>n</sub>. Pomocí ní bylo navrženo 10 párů mikrosatelitních primerů, které byly dále testovány na 68 jedincích buňňáka bělobradého. 4 lokusy byly vyhodnoceny jako monomorfní a dalších 6 vykazovalo polymorfismus s 3 až 9 alelami na lokus. Poté byly tyto polymorfní lokusy testovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 5–6 jedinců buňňáka Hallova, obrovského a tristanského, albatrosa černobrvého, stěhovavého a šedohlavého. U albatrosa stěhovavého byl jen 1 lokus polymorfní - Paequ2, u zbývajících druhů se vyskytovaly minimálně 3 polymorfní lokusy. Autoři neuvádí počty alel.

Bried *et al.* (2008) popsali 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Cd1 až Cd11) u buňňáka šedého. Z genomické DNA byla vytvořena obohacená genomová knihovna a poté z ní bylo vybráno 15 lokusů s největším počtem nepřerušovaných sekvencí a ty byly dále testovány na 43 jedincích buňňáka šedého. 11 z 15 lokusů vykazovalo polymorfismus s 2–8 alelami na lokus. Tyto polymorfní lokusy byly dále testovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace u albatrosa stěhovavého, buňňáka bělobradého a Bulwerova. U albatrosa stěhovavého se podařilo amplifikovat 5 lokusů a pouze u 1 z nich byl zaznamenán polymorfismus, u buňňáka bělobradého se amplifikovalo 7 lokusů, z nichž 2 byly polymorfní. Nejvyšší úspěšnost amplifikace byla pozorována u buňňáka Bulwerova, kdy se amplifikovalo všech 11 lokusů a 10 z nich vykazovalo

polymorfismus. Autoři neuvádí pro tyto lokusy počty alel. Pro lokus Cd4 byly všechny samice heterozygotní, což nasvědčuje tomu, že je tento lokus vázáný na pohlaví.

Lawrence (2008) našla 2 polymorfní mikrosatelitní lokusy (Tch6 a Tch25) u buňáka taiko. Z genomické DNA 145 jedinců byla sestavena genomová knihovna obohacená o di-, tri- a tetranukleotidové repetice. Pouze 9 lokusů obsahovalo vhodnou sekvenci, ke které byly poté navrženy páry primerů. PCR amplifikace proběhla úspěšně pouze u 4 lokusů a u 3 z nich byl detekován polymorfismus. Pouze lokus Tch6 byl nakonec vyhodnocen jako polymorfní s 2 alelami. U zbylých 2 lokusů byl polymorfismus způsoben výskytem nulových alel, anebo vzácnou delecí nebo inzercí, z tohoto důvodu byly tyto lokusy pro další analýzu vyřazeny. Dále autorka navrhla 9 párů mikrosatelitních primerů podle Hamilton *et al.* (1999), z nichž se jich 6 podařilo PCR amplifikovat, ale pouze u lokusu Tch25 se vyskytoval polymorfismus se 4 alelami.

Brown *et Jordan* (2009) charakterizovali 6 mikrosatelitních lokusů (Parm01 až Parm06) u buňáka trinidadského. Ze 3 mláďat byla vyizolována genomická DNA a následně sestavena genomová knihovna obohacená o (CA)<sub>n</sub> a (CAGA)<sub>n</sub> repetice, ze které byly navrženy páry primerů pro 43 mikrosatelitních lokusů. Ze všech testovaných lokusů byly jen 3 polymorfní, a to lokusy Parm01–Parm03, a bylo u nich detekováno 4 až 10 alel na lokus. Lokusy Parm04–Parm06 se jevily jako monomorfní, zbylé lokusy se nepodařilo amplifikovat. Těchto 6 lokusů bylo dále testováno pomocí *cross-species* PCR amplifikace na celkově 125 jedincích ze 17 druhů (1–17 jedinců z každého druhu) z řádu trubkonosí a na 8 jedincích tučňáka žltorohého. Nejvyšší úroveň polymorfismu byla zjištěna u lokusu Parm01, který byl celkově u 13 druhů tento lokus polymorfní s 2–9 alelami. Nejnižší polymorfismus byl detekován u lokusu Parm05, který byl polymorfní pouze u 3 druhů s 2 až 3 alelami.

Dalších 10 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Puff 1.5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2C, Puff G2F, Puff G11F, Puff PM2 a Puff Sma6) popsali Gonzalez *et al.* (2009) u buňáka baleárského. Byla vyizolována genomická DNA a poté z ní byla zkonstruována genomová knihovna, která byla obohacená o CA a AAAG repetice. Pomocí ní byly navrženy páry primerů pro 23 vybraných mikrosatelitních lokusů, které byly dále testovány celkem u 55 jedinců buňáka baleárského pocházejících ze 2 populací. 10 lokusů bylo určeno jako polymorfních a vyskytovalo se u nich 2–10 alel na lokus. Po další analýze bylo zjištěno, že lokus Puff Sma6 je lokalizovaný na pohlavním chromozomu W. Těchto 10 polymorfních lokusu bylo dále testováno u 23 jedinců

buňáka středomořského pomocí *cross-species* PCR amplifikace, kdy pouze lokus Puff G2F byl monomorfní a u zbylých 8 lokusů byl detekován polymorfismus s 2–9 alelami na lokus.

Andris *et al.* (2010) izolovali 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Bb2, Bb3, Bb7, Bb10, Bb11, Bb12, Bb20, Bb21, Bb22, Bb23 a Bb25) u buňáka Bulwerova. Z krve 1 jedince byla vyizolována genomická DNA, ze které byla poté vytvořena genomová knihovna obohacená o dinukleotidové repetice. Z této knihovny bylo vybráno 25 nejvhodnějších lokusů, podle kterých byly navrženy páry primerů. Těchto 25 párů primerů bylo testováno na 91 jedincích buňáka Bulwerova a ukázalo se, že pouze 1 lokus je monomorfní a zbytek lokusů je polymorfní. Kvůli problémům při PCR amplifikaci bylo dále pracováno pouze s 11 polymorfními lokusy, kde bylo detekováno 2–8 alel. Tyto lokusy byly také otestovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace u buňáka bělobradého, Monteirova a modravého (*Halobaena caerulea*) a minimálně 5 lokusů bylo pro každý druh polymorfních. Autoři neuvádí pro tyto lokusy počty alel.

Endemickým a ohroženým buňákem havajským se zabývali Welch *et* Fleischer (2011), u kterého charakterizovali 10 nových polymorfních mikrosatelitních lokusů (Ptero01 až Ptero10). Pro analýzu byla využita DNA, která byla vyizolována z 2 jedinců opačného pohlaví a poté byla vytvořena obohacená genomová knihovna o di-, tetra- a pentanukleotidové repetice. Byly navrženy primery pro 54 lokusů, které byly následně otestovány na 15 jedincích buňáka havajského. 10 z těchto lokusů vykazovalo polymorfismus s 3–10 alelami.

Quillfeldt *et al.* (2012) zkoumali paternitu u buňáků útlozobých žijících na Falklandských ostrovech a pro tyto účely u nich popsali 7 nových polymorfních mikrosatelitních lokusů (Patbel1 až Patbel7). Z genomické DNA bylo navrženo celkem 7 párů primerů pro vybrané lokusy a ty byly otestovány na 68 dospělých jedincích. Všechny lokusy byly vyhodnoceny jako polymorfní s 5–16 alelami na lokus. Také bylo zjištěno, že lokus Patbel5 se vyskytuje s vysokou pravděpodobností na pohlavním chromozomu Z, jelikož pro tento lokus nebyla žádná samice heterozygotní.

Hardesty *et al.* (2013) popsali 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Pc A105, Pc A107, Pc A115, Pc B11, Pc B109, Pc B115, Pc C104, Pc D3, Pc D103, Pc D109 a Pc D121) u buňáka světlenohého. Z genomické DNA vyizolované z peří a krve byla vytvořena genomová knihovna, která byla obohacená o tri- a tetranukleotidové repetitivní

sekvence. Bylo vybráno 11 nepřerušovaných sekvencí a k nim byly navrženy páry primerů, které byly dále otestovány na 84 jedincích buřňáka světlenohého pocházejících ze 3 populací. U všech 11 lokusů se vyskytoval polymorfismus a na lokus připadalo 3 až 13 alel.

Moodley *et al.* (2015) se zabývali genetickou strukturou a diverzitou několika populací buřňáků útlozobých a popsali u nich 25 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Z genomické DNA byla sestavena genomová knihovna obohacená o (CT)<sub>n</sub> a (GT)<sub>n</sub> repetitivní sekvence, ze které bylo zkonstruováno 36 párů primerů. Tyto primery byly otestovány *cross-species* PCR amplifikací na 4 nepříbuzných jedincích buřňáka útlozobého a na nepříbuzných 3 jedincích buřňáka holubího. Z otestovaných 36 lokusů bylo 26 polymorfních a u lokusu Pacbel\_00829 byla objevena signifikantní vazebná nerovnováha s lokusy Pacbel\_03731 a Pacbel\_08509, z tohoto důvodu byl tento lokus vyřazen z dalšího testování. Dále byl testován polymorfismus těchto 25 lokusů u 77 jedinců buřňáka útlozobého pocházejících ze 3 populací. U všech těchto lokusů byl detekován polymorfismus a úroveň polymorfismu byla mezi 5 až 48 alelami na lokus.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál pro testování byl získán zaměstnanci Safari Parku Dvůr Králové ze 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Z odebraných vzorků krve byla vedoucím mé bakalářské práce pomocí fenol-chloroformové izolační metody vyizolována genomická DNA, která byla poté rozpuštěna v TE pufru. Následně byla změřena její koncentrace pomocí spektrofotometru NanoDrop a poté naředěna tak, aby její koncentrace byla v rozmezí 10 až 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### 4.2 Seznam použitých chemikálií

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza ( $5 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTPs) ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 400  $\mu\text{l}$  každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol (96% roztok) (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid draselný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- Laurylsíran sodný (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N' - methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (AppliChem)

- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Tekuté stěračce Rain Off (Sheron)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (AppliChem)
- Triton X-100 (Amresco)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

### 4.3 Seznam použitých roztoků a jejich příprava

#### Fix/stop roztok

- 88 ml ledové kyseliny octové
- 800 ml deionizované vody

#### Nanášecí pufr

- 0,125 g xylenové modře
- 0,125 g bromfenolové modře
- 25 ml deionizované vody
- 100 ml formamidu
- Po smíchání chemikálií uchovat výsledný pufr v chladničce.

#### Reakční pufr pro PCR (10×)

- 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu
- 3,73 g chloridu draselného
- 80 ml deionizované vody
- 1 ml Triton X-100
- pH upravit na hodnotu 9,0 přidáním HCl a poté doplnit deionizovanou vodou do 100 ml.

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

- 0,8 g dusičnanu stříbrného
- 800 ml deionizované vody
- Uložit do chladničky a před použitím k vychlazenému roztoku přidat 1,2 ml formaldehydu.

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

- 40 g hydroxidu sodného rozpustit v 1 l deionizované vody

#### **Roztok kyseliny dusičné (1%)**

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

#### **Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu**

- 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
- 3  $\mu$ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

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

- 1 g peroxodisíran amonný
- 10 ml deionizované vody
- Roztok uchovat v chladničce.

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

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného
- 40  $\mu$ l N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu

#### **Vývojka**

- 800 ml deionizované vody
- 24 g uhličitanu sodného
- Uložit do chladničky a před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu$ l thiosíranu sodného.

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

- 420 g močoviny rozpustit v 484 ml deionizované vody
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu : N, N'- methylenbisakrylamidu v poměru 19:1
- 50 ml 10 $\times$  TBE
- Rozpustit všechny složky, poté zfiltrvat a uchovat v tmavé lahvi v chladničce.

#### **Zásobní roztok TBE pufru (10 $\times$ )**

- 108 g trishydroxymethylaminomethanu
- 55 g kyseliny borité
- 40 ml 0,5 mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> roztoku ethylendiaminotetraoctanu sodného, pH 8,0
- Doplnit deionizovanou vodou do 1 l.

#### 4.4 Seznam použitých laboratorních přístrojů

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipeta Finnpiquette 0,5–10  $\mu\text{l}$  - osmikanálová (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Finnpiquette 0,3  $\mu\text{l}$ –1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu\text{l}$ –1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever 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 Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler XP Thermal Cyclor (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Ice Flanker (Brema Ice Makers)

#### 4.5 PCR amplifikace DNA čápa simbila

Na genomické DNA z 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila byla provedena PCR amplifikace. Byla připravena PCR reakční směs pro 6 vzorků a do každé PCR směsi byl přidán jeden pár primerů pro amplifikaci daného mikrosatelitního lokusu.

1. Rozmrazit všechny složky PCR směsi a poté je zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Do 1,5ml mikrozkušavky napipetovat jednotlivé složky podle Tabulky č. 1 a poté PCR směs zvortexovat a zcentrifugovat.



**Tabulka č. 1:** Složení PCR směsi pro 6 vzorků.

Složka PCR směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Objem složek pro 6 vzorků [ $\mu\text{l}$ ]
Deionizovaná voda	-	43,9
Reakční pufr pro PCR	10×	6,7
Roztok $\text{MgCl}_2$	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	4,0
Roztok dNTPs	20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,7
Primer R	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	3,3
Primer F	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,5

- Osmikanálovou pipetou napipetovat 1  $\mu\text{l}$  genomické DNA všech 6 jedinců do 6 předem popsáných PCR mikrozkuvek. Poté připipetovat do jednotlivých PCR mikrozkuvek ke genomické DNA 9  $\mu\text{l}$  připravené PCR směsi.
- PCR mikrozkuvky s napipetovanými vzorky důkladně uzavřít, vložit do termocykleru a nastavit teplotní program podle Tabulky č. 2. Základní teplota *annealingu*, která byla použita u všech vzorků během prvního testování, byla 50 °C. Během dalšího testování byla tato teplota optimalizována, u některých vzorků byla buď zvýšena nebo snížena. Detailní vysvětlení je uvedeno v kapitole č. 5 Výsledky.

**Tabulka č. 2:** Teplotní a časový profil PCR reakce.

Krok PCR	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	30 s	
Annealing	50	30 s	35
Elongace	72	30 s	
Finální elongace	72	7 min	1

#### 4.6 Amplifikované mikrosatelitní lokusy u čápa simbila

Ke *cross-species* PCR amplifikaci genomické DNA čápa simbila bylo použito celkem 213 párů primerů. 207 párů primerů bylo navrženo pro PCR amplifikaci mikrosatelitních lokusů vyskytujících se u druhů z řádu trubkonosí (Procellariiformes), 5 párů primerů pro zástupce řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) a 1 pár primerů

navržených pro lesňáčka žlutohého z řádu pěvci (Passeriformes). Seznam těchto testovaných mikrosatelitních lokusů je uveden v Tabulce č. 3, 4, 5 a 6.

**Tabulka č. 3:** Testované mikrosatelitní lokusy popsány u druhů z čeledi albatrosovití.

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

**Tabulka č. 4:** Testované mikrosatelitní lokusy popsány u druhů z čeledi buňňáčkovití.

Mikrosatelitní lokus	Zdrojový druh	Literární zdroj
Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B	buňňáček madeirský ( <i>O. castro</i> )	Sun <i>et al.</i> , 2009
O110-39		
Ole01, Ole02, Ole03, Ole04, Ole05, Ole06, Ole07, Ole08, Ole09, Ole10, Ole11, Ole12, Ole13, Ole14, Ole15, Ole16, Ole17, Ole18, Ole19, Ole20, Ole21, Ole22, Ole23, Ole24, Ole25, Ole26	buňňáček dlouhokřídý ( <i>O. leucorhoa</i> )	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
Omn1, Omn2, Omn3, Omn4, Omn6, Omn7, Omn8, Omn11, Omn14, Omn15, Omn16, Omn17, Omn21, Omn22, Omn23, Omn24, Omn25, Omn28	buňňáček Monteirův ( <i>O. monteiroi</i> )	Bried <i>et al.</i> , 2012

**Tabulka č. 5:** Testované mikrosatelitní lokusy popsané u druhů z čeledi buňákovití.

<b>Mikrosatelitní lokus</b>	<b>Zdrojový druh</b>	<b>Literární zdroj</b>
Paequ2, Paequ3, Paequ4, Paequ7, Paequ8, Paequ10, Paequ13	buňák bělobradý ( <i>P. aequinoctialis</i> )	Techow <i>et O'Ryan</i> , 2004
Cd1, Cd2, Cd3, Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd10, Cd11	buňák šedý ( <i>C. diomedea</i> )	Bried <i>et al.</i> , 2008
Tch6, Tch25	buňák taiko ( <i>P. magentae</i> )	Lawrence, 2008
Parm01, Parm02, Parm03, Parm04, Parm05, Parm06	buňák trinidatský ( <i>P. arminjoniana</i> )	Brown <i>et Jordan</i> , 2009
Puff 1.5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2C, Puff G2F, Puff G11F, Puff PM2, Puff Sma6	buňák baleárský ( <i>P. mauretanicus</i> )	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
Bb2, Bb3, Bb7, Bb10, Bb11, Bb12, Bb20, Bb21, Bb22, Bb23, Bb25	buňák Bulwerův ( <i>B. bulwerii</i> )	Andris <i>et al.</i> , 2010
Ptero01, Ptero02, Ptero03, Ptero04, Ptero05, Ptero06, Ptero07, Ptero08, Ptero09, Ptero10	buňák havajský ( <i>P. sandwichensis</i> )	Welch <i>et Fleischer</i> , 2011
Patbel1, Patbel2, Patbel3, Patbel4, Patbel5, Patbel6, Patbel7	buňák útlozobý ( <i>P. belcheri</i> )	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012
Pc A105, Pc A107, Pc A115, Pc B11, Pc B109, Pc B115, Pc C104, Pc D3, Pc D103, Pc D109, Pc D121	buňák světlenohý ( <i>P. carneipes</i> )	Hardesty <i>et al.</i> , 2013
Pacbel_00386, Pacbel_02653, Pacbel_03731, Pacbel_04240, Pacbel_04355, Pacbel_04991, Pacbel_07265, Pacbel_08509, Pacbel_08867, Pacbel_08988, Pacbel_09021, Pacbel_09528, Pacbel_09957, Pacbel_10033, Pacbel_10895, Pacbel_12344, Pacbel_15293, Pacbel_15327, Pacbel_16671, Pacbel_16989, Pacbel_17529, Pacbel_17944, Pacbel_17986, Pacbel_19907, Pacbel_20784	buňák útlozobý	Moodley <i>et al.</i> , 2015

**Tabulka č. 6:** Testované mikrosatelitní lokusy popsané u druhů z řádu dlouhokřídlí a pěvci.

Mikrosatelitní lokus	Řád	Čeleď	Zdrojový druh	Literární zdroj
Dpu01	pěvci	lesňáčkovití	lesňáček žlutohý ( <i>D. petechia</i> )	Friesen <i>et al.</i> , 2006 podle Dawson <i>et al.</i> , 1997
Cco5-21		alkovití	alkoun holubí ( <i>C. columba</i> )	Friesen <i>et al.</i> , 2006
Calex-01	dlouhokřídlí	kulíkovití	kulík mořský ( <i>C. alexandrinus</i> )	Brown <i>et Jordan</i> , 2009 podle Küpper <i>et al.</i> , 2007
RBG18, RBG18M, RBG29		rackovití	racek novozélandský ( <i>L. scopulinus</i> )	Lawrence, 2008; Welch <i>et Fleischer</i> , 2011 podle Given <i>et al.</i> , 2002

#### 4.7 Elektroforetická separace PCR produktů

Pro separaci PCR produktů byl přichystán 6% denaturující polyakrylamidový gel, který byl nalit mezi velké sklo s rozměry 330 × 420 mm a malé sklo s rozměry 330 × 390 mm, tloušťka gelu byla 0,4 mm. PCR produkty byly následně rozseparovány ve vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrce S2 (Whatman Biometra) a po separaci byly vizualizovány dusičnanem stříbrným. Celý postup byl proveden následovně:

##### Ošetření skel

1. Plochu velkého skla, která bude v kontaktu s gelem, vyčistit za pomoci papírových ubrousků deionizovanou vodou a ethanolem ve dvou opakováních.
2. Na vyčištěnou plochu velkého skla nanést přípravek odpuzující vodu (RainOff) a rozetřít ho dobře po celé ploše pomocí úzkého proužku (cca 1 cm) papírového ubrousku. Po zaschnutí přípravku (cca 3 min) tuto ošetřenou plochu 2× omýt deionizovanou vodou a osušit papírovými ubrousky.
3. Plochu malého skla, která bude v kontaktu s gelem, vyčistit za pomoci papírových ubrousků deionizovanou vodou a ethanolem ve dvou opakováních. Malé sklo přemístit do digestoře na polystyrenovou destičku a na omytou plochu nanést roztok obsahující 3 μl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu rozpuštěného

v 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu a rozetřít ho dobře po celé ploše pomocí úzkého proužku papírového ubrousku. Po zaschnutí (cca po 3 min) omýt tuto plochu 4× ethanolem a osušit papírovými ubrousky.

4. Položit velké sklo ošetřenou plochou nahoru do digestoře na druhou polystyrenovou destičku a k jeho okrajům umístit dva spacery. Malé sklo v ruce otočit, položit ošetřenou plochou dolů na velké sklo, zarovnat spacery podél hran skel a přirazit pořádně malé sklo ke gumičkám spaceru. V místě spacerů z každé strany sepnout 2 malými svorkami.

### **Příprava 6% roztoku polyakrylamidového gelu**

1. V digestoři do válce odměřit a do kádinky přelít 60 ml pracovního roztoku akrylamidu : N, N'- methylenbisakrylamidu. Mikropipetou k němu přidat do kádinky 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného a 40  $\mu$ l N, N, N', N' – tetramethylethyldiaminu. Krouživými pohyby směs opatrně promíchat.
2. Za současného poklepávání na sklo vyplnit prostor mezi skly přichystaným 6% roztokem polyakrylamidového gelu.
3. Hřebínek zasunout rovnou stranou do prostoru mezi skly do hloubky cca 5 mm od okraje malého skla a obě skla v místě hřebínku sepnout 4 velkými svorkami.
4. Zbytek roztoku v kádince přelít do určené nádoby a připravený gel nechat tuhnout po dobu jedné hodiny.

### **Elektroforetická separace**

1. Po ztuhnutí gelu všechny svorky odstranit, skla namočit a kartáčem jemně odstranit zbytky gelu v místě hřebínku. Vnější stranu malého skla opláchnout vodou a tu poté setřít pryč pomocí stěrky na sklo.
2. Skla s gelem umístit do sekvenační komůrky hřebínkem nahoru tak, aby vnější plocha malého skla těsně doléhala na hliníkovou desku komůrky a poté připevnit skla pomocí šroubů ke komůrce. Do horního (katodového) a dolního (anodového) prostoru komůrky nalít 0,5× TBE pufr.

3. Vyjmout hřebínek a vzniklý prostor mezi skly projet plastovou stěrku, tak aby nebyl poškozen gel, a vypláchnout pomocí injekční stříkačky, aby v tomto prostoru nebyly žádné zbytky gelu.
4. Horní a dolní prostor komůrky uzavřít a připojit ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastaveného na napětí 3 000 V, proud 150 mA, výkon 90 W a nechat 30 minut nahřívat gel.
5. Během nahřívání gelu ke každému z PCR produktů připipetovat 5  $\mu$ l nanášejícího pufru a cca 2 minuty před koncem nahřívání vložit vzorky do termocyklieru a nechat je 3 minuty denaturovat. Mezitím si připravit nádobu s ledem a po uplynutí času denaturace ihned umístit vzorky do ledu.
6. Po uplynulém času nahřívání gelu zastavit zdroj elektrického proudu, odpojit elektrody a opět pomocí plastové stěrky a injekční stříkačky vyčistit prostor mezi skly od zbytku gelu, močoviny a vzduchových bublin. Hřebínek ihned zasunout do gelu cca 1 mm hluboko.
7. Do prostoru mezi zoubky hřebínku nanést osmikanálovou pipetou po 2  $\mu$ l každého vzorku. Mezi opakováními promývat špičky a poté je otřít o papírový ubrousek.
8. Horní prostor komůrky opět uzavřít, připojit elektroforetickou aparaturu ke zdroji elektrického proudu, změnit hodnotu výkonu na 70 W a nechat vzorky separovat po dobu 90 minut.
9. V době separace vzorků připravit roztoky pro vizualizaci gelu (viz podkapitola 4.3 Seznam použitých roztoků a jejich příprava): vývojka, fix/stop roztok, roztok kyseliny dusičné (1%), roztok dusičnanu stříbrného (0,1%).
10. Po dokončení elektroforetické separace vypnout a odpojit zdroj stejnosměrného elektrického proudu, mírně uvolnit šroub na odtok pufru z horního prostoru a poté uvolnit šrouby upevňující skla s gelem k aparatuře.
11. Skla s gelem přenést z komůrky na vodorovnou plastovou podložku, vyjmout oba spacery a pomocí čepele nože od sebe skla opatrně oddělit.

## Vizualizace gelu

1. Malé sklo s přichyceným gelem nahoru umístit do první fotomisky, miskou poté položit na třepačku, zalít fix/stop roztokem a nechat působit 20 minut. Po uplynutí tohoto času fix/stop roztok slít zpět do baňky a sklo s gelem promýt 3× po dvou minutách deonizovanou vodou.
2. Fotomisku s gelem opět položit na třepačku, zalít 1% roztokem kyseliny dusičné a nechat působit 4 minuty. Po uplynutí této doby roztok vylít do odpadu a promýt sklo s gelem 4× po dvou minutách deonizovanou vodou.
3. Při promývání přidat 1 200 µl formaldehydu k 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného. Sklo s gelem vložit do druhé fotomisky, umístit ji na třepačku a zalít gel tímto roztokem.
4. Těsně před uplynutím 30 minut naplnit třetí fotomisku deonizovanou vodou a přidat k vychlazené vývojce 1 200 µl formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného.
5. Po 30 minutách působení roztoku dusičnanu stříbrného na gel slít tento roztok zpět do zásobní lahve a sklo s gelem ponořit na 5 sekund do třetí fotomisky naplněné vodou a poté přemístit sklo do čtvrté fotomisky umístěné na třepačce a zalít vývojkou.
6. Šedě zbarvené PCR produkty v gelu zalít fix/stop roztokem a zastavit tím jeho barvení. Po vyšumění bublin vylít roztok do odpadu a gel přemístit do třetí fotomisky s připravenou deonizovanou vodou.
7. Sklo s gelem v místě spaceru osušit papírovým ubrouskem, popsat, nechat poté okapat a umístit do sušárny. Po hodině sušení gel vyndat, nechat vychladnout, vyhodnotit na negatoskopu a naskenovat do počítače.
8. Sklo s vyhodnoceným gelem ponořit do 1 mol·l<sup>-1</sup> roztoku hydroxidu sodného, poté očistit kartáčem a omýt deonizovanou vodou se saponátem.

## 5 Výsledky

Pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace jsem v rámci experimentální části mé bakalářské práce hledal polymorfní mikrosatelitní lokusy na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila za použití celkem 213 párů primerů, které dříve amplifikovaly polymorfní produkty u druhů z řádu trubkonosí. 207 párů primerů pocházelo od zástupců z řádu trubkonosí - 53 od druhů z čeledi albatrosovití, 54 od druhů z čeledi buňňáčkovití a 100 od druhů z čeledi buňňákovití. Další 5 párů primerů, které byly použity při hledání polymorfních lokusů, pocházelo od zástupců z řádu dlouhokřídlí, a to od alkouna holubího, kulíka mořského a racka novozélandského. Poslední testovaný pár primerů byl popsán u lesňáčka žlutohého z řádu pěvci.

Všech 213 párů primerů jsem nejdříve testoval při teplotě *annealingu* 50 °C a poté byly teploty optimalizovány specificky zvlášť pro každý mikrosatelitní lokus. Pokud byl žádný nebo slabý PCR produkt, tak teplota byla postupně snižována až na 44 °C, v případě že byl produkt velmi tmavý a špatně hodnotitelný, tak teplota byla zvyšována až na 69 °C. Pro lepší hodnocení alel a určení genotypů jedinců byla pro některé lokusy upravena v PCR směsi původní koncentrace hořečnatých iontů (tj. 1,58 mmol·l<sup>-1</sup>) na koncentraci třičtvrtěční (tj. 1,18 mmol·l<sup>-1</sup>), tzn. do PCR směsi byly místo 4 µl roztoku hořečnatých iontů napipetovány 3 µl a o tento rozdílný objem (tj. 1 µl) byla navýšena deionizovaná voda, aby se nezměnil celkový objem PCR reakce. Tato optimalizace byla provedena u 3 mikrosatelitních lokusů, a to u lokusu De3, Omn8 a Pabel\_16989. Také u přibližně poloviny lokusů byla elektroforetická separace prodloužena z 90 až na 240 minut pro jejich lepší vyhodnocení.

Ze všech 213 testovaných mikrosatelitních lokusů poskytlo polymorfní PCR produkt 26 párů testovaných primerů (viz Tabulka č. 7) a monomorfní PCR produkt zbylých 187 párů testovaných primerů.



**Tabulka č. 7:** Charakteristika 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly testovány na 6 nepříbuzných jedincích čápa simbila. V tabulce je uveden název lokusu s daným *Accession number* uvedeným v databázi GenBank, zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel, čas elektroforetické separace a teplota *annealingu* ( $T_A$ ).

Mikrosatelitní lokus (GenBank <i>Acc. No.</i> )	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	Počet alel	Čas separace [min]	$T_A$ [°C]
<b>11H7</b> (AY945753)	albatros stěhovavý	F: GCAAGCTAAGTTGGGGGTAA R: ACAGTAGGGCTGCTGCAGAT	AC	2	180	63
<b>BFAL4</b> (neuvedeno)	albatros čermonohý	F: TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R: GTTTGCCATTTTAAACTGTCATTGGC	TC	2	90	65
<b>De3*</b> (AF096789)	albatros stěhovavý	F: CTGCCAAAAAGAATTCCCTG R: CCAACAAGGACTAAGCCCAA	AC	4	90	55
<b>STAL18</b> (neuvedeno)	albatros bělohřbetý	F: CAGTTCCAAAGAAGGAAAACC R: GTTTGGAGTGGTCTTGGGTACAGC	ATG	3	150	64
<b>Ole10</b> (FR696386)		F: ACCAGCTCCTAACTGGAAGCCAC R: TGCAGGTAGGTTCTCAGTATGCAAAGG	CA	2	180	59
<b>Ole19</b> (FR696395)	buňáček dlouhokřídlý	F: GAAGGCTCTCAAGGGTCAAG R: TTTGGGAGAAGTTCAGTAGAAGAAC	GA	4	150	56
<b>Ole21</b> (FR696397)		F: CCACGAGAAATGGACATACAAC R: TGAAGAACTCCGAAATAACTGTG	GA/A/GAAA	2	120	65
<b>Omn2</b> (JQ303227)	buňáček Monteirův	F: GATTCGTCTTGCTTCCAAA R: AACAAATAACCAGGATTGATAATA	AC/AT	2	180	62

Tabulka č. 7: Pokračování 1.

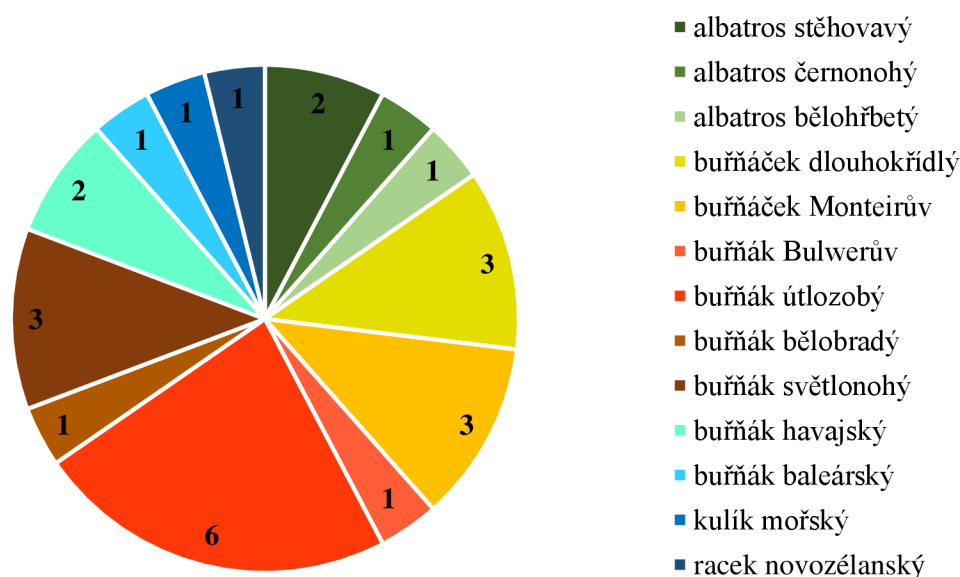
Mikrosatelitní lokus (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Počet alel	Čas separace [min]	T <sub>A</sub> [°C]
<b>Omn8*</b> (JQ303232)	buňáček Monteirův	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTA	AC	6	90	59
<b>Omn25</b> (JQ303242)		F: TCTGCTCCCCCTGATTATTG R: ACTCTGAGAGCCATCCATCA	ATGG	3	180	58
<b>Bb21</b> (HM171897)	buňák Bulwerův	F: CTGATGTTCCAGGCCCTAAT R: CCTCTGAGCCAGCTAATTCC	TG	2	240	67
<b>(Pacbel_07265)</b> (neuvedeno)		F: CGTCACTTTAATAGCGCTGGC R: ACCCTGATTTTCCCAGTCCG	GT	2	90	61
<b>Pacbel_16989*</b> (neuvedeno)	buňák útlozobý	F: TGCTTTTGGACAATGTGGAGG R: TCTGGTACACTTCTCATTGGAC	CA	2	90	60
<b>Pacbel_17944</b> (neuvedeno)		F: TACAACCGTTCTCCCTGTGG R: GGAGAAGCAGGCAGCAATAC	TG	2	90	69
<b>Pacbel_19907</b> (neuvedeno)		F: TTTCTCCTTAGCTCGGCAGG R: CCATACTTGGTGGCAGTGTG	AG	2	90	53
<b>Paequ8</b> (AY371074)	buňák bělobradý	F: TATTCTGAGACTTGC GTTATCC R: GTGATCCATTAGTTGATGTCTACTG	CA	2	90	44
<b>Patbell</b> (JF288775)	buňák útlozobý	F: CCCTTGCTGCAGCTCATTAT R: GGAATGGCTGAAAGAGTGCT	CTAT/CTAC	2	180	63

Tabulka č. 7: Pokračování 2.

Mikrosatelitní lokus (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	Počet alel	Čas separace [min]	T <sub>A</sub> [°C]
<b>Patbel2</b> (JF288776)	buňák útlózobý	F: GGTGTCATGCAACTGACTGAA R: CAATGGGAATGGCAGAGACT	CTAT	4	240	66
<b>Pc A115</b> (JX435473)		F: CCCTCACCACAGGTTTATG R: CTGCCAAGTCCACCACTA	GT	2	180	62
<b>Pc B109</b> (JX435475)	buňák světlenohý	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATTGAGGATGTAGGTTC	CAA	2	120	66
<b>Pc D103</b> (JX435479)		F: GGAAAGATGTCATGCTGATGA R: GTGGGAGATTCATAGGCAAAG	GATA/GATG	3	90	53
<b>Ptero02</b> (HQ918219)		F: AAGCGCTTCACTGGAGGA R: TGACCTGTGTGCCTTCATTC	CA	4	180	63
<b>Ptero09</b> (HQ918226)	buňák havajský	F: GCAAATACCAGTCTTCCAAAGG R: TTTAAGATAAAGATGTTTGAGAACCAC	AAGG	3	90	62
<b>Puff G2C</b> (EU158898)	buňák baleárský	F: CTGAAATCAGACATTATTTTC R: ACAATATGCAAACCTTTTIG	GT	2	90	55
<b>Calex-01</b> (AM072445)	kulík mořský	F: CTTCTCCATTGTTGTCACCTCCAGT R: CTTGACTTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT/GTGC	2	150	69
<b>RGB18M</b> (HQ918229)	racek novozélandský	F: TTGTTCCCTGGCTTCTATCTC R: CGCTGAAGATGTAGAGGGAAA	GT	2	90	60

Legenda: \* - tříčtvrteční koncentrace hořčičných iontů v PCR směsi (1,18 mmol·l<sup>-1</sup>)

Z celkově 213 testovaných mikrosatelitních lokusů u čápa simbila byl zjištěn u 26 z nich polymorfismus, to je 12,2 % z celkového počtu analyzovaných lokusů. Z těchto 26 polymorfních lokusů bylo 24 popsáno u zástupců z řádu trubkonosí a 2 u zástupců z řádu dlouhokřídlí, a to u kulíka mořského a racka novozélandského. V rámci testovaných lokusů od zástupců z řádu trubkonosí byla nejvyšší míra úspěšnosti při nalezení polymorfismu od čeledi buňákovití, kde bylo 14 ze 100 lokusů polymorfních, což je 14 %. Zároveň bylo od této čeledi detekováno nejvíce polymorfních lokusů v rámci jednoho druhu, a to 6 lokusů původem od buňáka útlozobého. Od čeledi buňáčkovití vykazovalo polymorfismus 6 z 54 lokusů, tedy úspěšnost testování byla 11,1 %. Nejméně polymorfních lokusů bylo pozorováno od čeledi albatrosovití, kde byly nalezeny pouze 4 z celkově 53 testovaných lokusů, tudíž úspěšnost nalezení polymorfismu byla 7,5 %. Přehled polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila podle druhů, ze kterých byly izolovány, je uveden na Obrázku č. 3.



**Obrázek č. 3:** Rozdělení 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů detekovaných u čápa simbila vzhledem k druhům, u nichž byly izolovány. Čísly je vyjádřen počet nalezených polymorfních mikrosatelitních lokusů vzhledem k zdrojovému druhu.

Z pohledu počtu alel se u 26 nalezených polymorfních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila nacházelo 2 až 6 alel na jeden lokus. U 17 lokusů byly detekovány dvě alely, u 4 lokusů tři a u 4 lokusů čtyři alely. Největší polymorfismus vykazoval lokus Omn8, kde bylo nalezeno až 6 alel. U všech 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila byly určeny jejich genotypy a heterozygotnost pro všechny nalezené polymorfní lokusy - viz Tabulka č. 8.

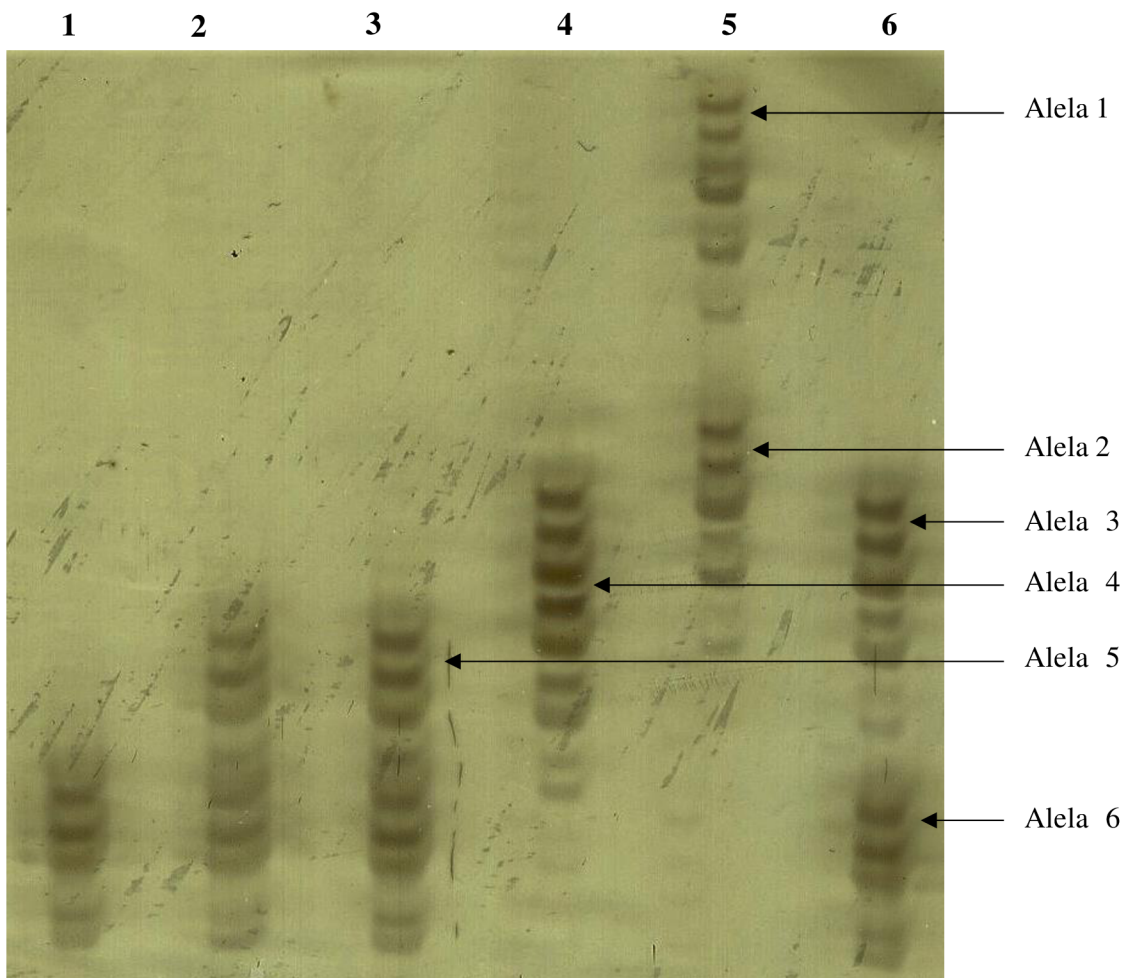
**Tabulka č. 8:** Genotypy 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila pro u nich nalezených 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů. V tabulce je uveden název mikrosatelitního lokusu, řád a druh u nichž byly dříve tyto lokusy popsány, počet alel a genotypů, heterozygotnost a genotypy jednotlivých jedinců.

Mikrosatelitní lokus	Řád	Zdrojový druh	Počet alel	Počet genotypů	Heterozygotnost	Genotyp u jedince					
						1	2	3	4	5	6
11H7	albatrosovití	albatros stěhovavý	2	2	0,17	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
BFAL4		albatros černonohý	2	2	0,50	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	1/2
De3		albatros stěhovavý	4	5	1,00	1/3	2/3	2/4	3/4	2/3	1/4
STAL18		albatros bělohřbetý	3	4	0,50	3/3	2/3	2/3	1/3	2/2	3/3
Ole10	buňňáčkovití	buňňáček dlouhokřídlý	2	3	0,17	1/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1
Ole19			4	6	0,67	2/2	2/3	1/4	1/2	3/3	2/4
Ole21		2	3	0,17	2/2	1/2	1/1	1/1	2/2	2/2	
Omn2		2	2	0,33	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	
Omn8		buňňáček Monteirův	6	5	0,83	6/6	5/6	5/6	3/4	1/2	3/6
Omn25		3	5	0,50	2/2	3/3	2/3	1/2	2/3	3/3	
Calex-01	dlouhokřídlí	kulík mořský	2	2	0,50	1/2	1/2	1/2	2/2	2/2	2/2
RBG18M		racek novozélandský	2	2	0,17	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2

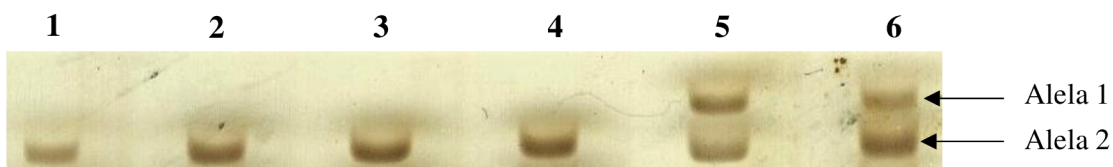
Tabulka č. 8: Pokračování.

Mikrosatelitní lokus	Řád	Zdrojový druh	Počet alel	Počet genotypů	Heterozygotnost	Genotyp u jedince					
						1	2	3	4	5	6
Bb21		buřňák Bulwerův	2	2	0,17	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2
Pacbel_07265			2	2	0,33	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	2/2
Pacbel_16989			2	3	0,50	1/1	2/2	1/2	1/2	1/1	1/2
Pacbel_17944		buřňák útlozobý	2	2	0,17	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1
Pacbel_19907			2	3	0,66	1/2	1/2	1/2	1/1	1/2	2/2
Paequ8		buřňák bělobradý	2	2	0,83	1/2	1/2	1/2	2/2	1/2	1/2
Patbel1	buřňákovití		2	2	0,50	1/2	1/2	1/2	2/2	2/2	2/2
Patbel2		buřňák útlozobý	4	4	1,00	3/4	1/3	2/3	2/3	1/2	2/3
Pc A115			2	2	0,17	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1
Pc B109		buřňák světlenohý	2	2	0,17	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Pc D103			3	3	0,50	1/3	2/3	3/3	3/3	3/3	2/3
Ptero02			4	4	0,83	2/3	1/2	3/4	2/3	2/2	2/3
Ptero09		buřňák havajský	3	3	0,50	2/2	1/2	2/2	2/3	1/2	2/2
Puff G2C		buřňák baleárský	2	3	0,17	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/2

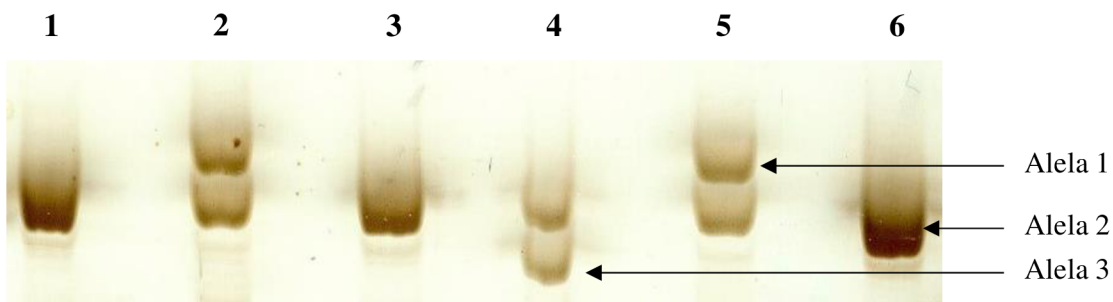
Hodnocení mikrosatelitních lokusů nebylo vždy jednoduché a optimalizace podmínek PCR amplifikace nebo elektroforetické separace někdy nestačila. Některé lokusy obsahovaly i jiné produkty PCR amplifikace, stíny hlavních produktů nebo další extra produkty. Mezi tyto problematické lokusy lze zařadit např. lokus Omn8 (viz Obrázek č. 4). Naopak jiné mikrosatelitní lokusy byly velmi dobře hodnotitelné jako např. lokus Puff G2C (viz Obrázek č. 5), Ptero09 (viz Obrázek č. 6), Pc D103 (viz Obrázek č. 7) a Pacbel\_19907 (viz Obrázek č. 8).



**Obrázek č. 4:** Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Omn8 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. PCR amplifikace tohoto lokusu probíhala při  $T_A$  59 °C s tříčtvrteční koncentrací hořčičných iontů a délka separace byla 90 minut. Šipkami je na obrázku vyznačeno 6 alel a číslice 1–6 označují jednotlivé jedince.



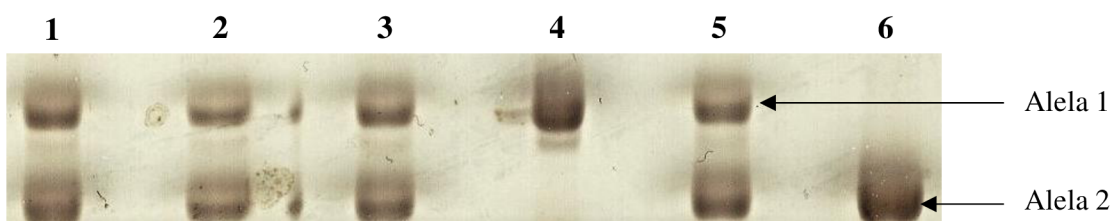
**Obrázek č. 5:** Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Puff G2C testovaného u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. PCR amplifikace tohoto lokusu probíhala při  $T_A$  55 °C a délka separace byla 90 minut. Šípkami jsou na obrázku vyznačeny 2 alely a číslice 1–6 označují jednotlivé jedince.



**Obrázek č. 6:** Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Ptero09 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. PCR amplifikace tohoto lokusu probíhala při  $T_A$  62 °C a délka separace byla 90 minut. Šípkami jsou na obrázku vyznačeny 3 alely a číslice 1–6 označují jednotlivé jedince.



**Obrázek č. 7:** Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Pc D103 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. PCR amplifikace tohoto lokusu probíhala při  $T_A$  53 °C a délka separace byla 90 minut. Šípkami jsou na obrázku vyznačeny 3 alely a číslice 1–6 označují jednotlivé jedince.



**Obrázek č. 8:** Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Pacbel\_19907 testovaného u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. PCR amplifikace tohoto lokusu probíhala při  $T_A$  53 °C a délka separace byla 90 minut. Šípkami jsou na obrázku vyznačeny 2 alely a číslice 1–6 označují jednotlivé jedince.



## 6 Diskuse

V této bakalářské práci jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace hledal polymorfní mikrosatelitní lokusy u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila. Celkově jsem otestoval 213 párů mikrosatelitních primerů, z nichž bylo 207 párů dříve popsáno u druhů z řádu trubkonosí. Také jsem otestoval 6 párů mikrosatelitních primerů, které byly dříve navrženy pro mikrosatelitní lokusy nacházející se u zástupců z jiných řádů ptáků a byly úspěšně jako *cross-species* testovány u zástupců z řádu trubkonosí, kdy 5 párů bylo popsáno u druhů z řádu dlouhokřídlí a 1 pár u lesňáčka žlutohého z řádu pěvců. Pomocí všech těchto testovaných párů primerů jsem našel 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů s 2–6 alelami na lokus.

V rámci čeledě albatrosovití bylo popsáno v 5 publikacích 53 párů primerů, které jsem testoval pomocí *cross-species* PCR amplifikace na 6 nepříbuzných jedincích čápa simbila. S použitím těchto primerů byly detekovány 4 polymorfní lokusy, a to 11H7 a De3 od albatrose stěhovavého, BFAL4 od albatrose bělohřbetého a STAL18 od albatrose černonohého. Pro čeleď buňňáčkovití bylo ve 3 člancích charakterizováno 54 párů primerů, kdy mi při testování těchto párů primerů 6 poskytlo polymorfní produkt u lokusů Ole10, Ole19 a Ole21 popsanych u buňňáčka dlouhokřídlého a u lokusů Omn2, Omn8 a Omn25 charakterizovaných u buňňáčka Monteirova. Od čeledi buňňákovití jsem měl k dispozici 100 párů primerů, které byly popsány v 10 publikacích a při mém testování poskytly 14 polymorfních produktů, a to u lokusu Bb21 charakterizovaného u buňňáka Bulwerova, u lokusů Pacbel\_07265, Pacbel\_16989, Pacbel\_17944, Pacbel\_19907, Patbel1 a Patbel2 popsanych u buňňáka útlozobého, u lokusu Paequ8 charakterizovaného u buňňáka bělobradého, u lokusů Pc A115, Pc B109 a Pc D103 popsanych u buňňáka světlenohého, u lokusů Ptero02 a Ptero09 charakterizovaných u buňňáka havajského a u lokusu Puff G2C popsaného u buňňáka baleárského. Dále jsem testoval 5 párů mikrosatelitních primerů z řádu dlouhokřídlí popsanych ve 3 publikacích, kdy jsem pomocí nich detekoval 2 polymorfní mikrosatelitní lokusy - Calex-01 popsaný u kulíka mořského a RBG18M charakterizovaný u racka novozélandského. U všech těchto polymorfních lokusů jsem porovnal mnou a v publikacích použité teploty *annealingu* a počty nalezených alel pro dané lokusy - viz Tabulka č. 9.

V porovnání s publikacemi jsem testoval 21 mnou nalezených polymorfních lokusů u čápa simbila na vyšší teploty *annealingu* oproti autorům. Na rozdíl od toho jsem

lokusy Ole10, Ole19, Pacbel\_019907, Paequ8 a Pc D103 testoval na nižší teploty *annealingu* v porovnání s testováním v publikacích. Při srovnání počtu alel mnou nalezených polymorfních lokusů v této práci s publikacemi jsem pouze u 1 lokusu našel částečně více alel než autor publikace. U lokusu De3 jsem detekoval 4 alely u 6 jedinců čápa simbila, Burg (1999) našla 3 alely u 50 jedinců albatrosa černobrvého a u 90 jedinců albatrosa stěhovavého, ale také detekovala 4 alely u 50 jedinců albatrosa šedohlavého. U zbylých polymorfních lokusů nalezených v této bakalářské práci se vyskytovalo méně alel než v uvedených publikacích. Je to z důvodu menšího počtu testovaných jedinců pro určitý lokus.

**Tabulka č. 9:** Porovnání mnou testovaných teplot *annealingu* a detekovaného počtu alel pro nalezené polymorfní mikrosatelitní lokusy u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila s publikacemi. V tabulce je uveden název mikrosatelitního lokusu, zdrojový druh, teplota *annealingu* použita při testování v této práci ( $T_{A-M}$ ), teplota *annealingu* použita v publikaci ( $T_{A-P}$ ), počet alel detekovaných v této práci (N-M), počet alel detekovaných v publikaci (v závorce je uvedený počet testovaných jedinců pro daný lokus) (N-P) a autor dané publikace.

Mikrosatelitní lokus	Zdrojový druh	$T_{A-M}$ [°C]	N-M (6)	$T_{A-P}$ [°C]	N-P	Publikace
11H7	albatros stěhovavý	63	2	58	10 (60)	Dubois <i>et al.</i> , 2005
BFAL4	albatros černonohý	65	2	60	8 (36) 4 (12)	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
De3	albatros stěhovavý	55	4	50 54	3 (50) 3 (90) 4 (50)	Burg, 1999
STAL18	albatros bělohřbetý	64	3	60	7 (36) 7 (12)	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
Ole10	buňáček dlouhokřídý	59	2	60	3 (24)	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
Ole19		56	4	60	8 (23)	
Ole21		65	2	60	21 (24)	
Omn2	buňáček Monteirův	62	2	58	7 (125)	Bried <i>et al.</i> , 2012
Omn8		59	6	58	10 (125)	
Omn25		58	3	58	5 (125)	
Bb21	buňák Bulwerův	67	2	60	3 (91)	Andris <i>et al.</i> , 2010
Pacbel_07265	buňák útlozobý	61	2	56	15 (74)	Moodley <i>et al.</i> , 2015
Pacbel_16989		60	2	56	10 (75)	
Pacbel_17944		69	2	56	12 (75)	
Pacbel_19907		53	2	56	8 (74)	
Paequ8	buňák bělobradý	44	2	58	3 (77)	Techow <i>et O'Ryan</i> , 2004
Patbel1	buňák	63	2	*	7 (68)	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012
Patbel2	útlozobý	66	4	*	16 (68)	

Tabulka č. 9: Pokračování.

Mikrosatelitní lokus	Zdrojový druh	T <sub>A</sub> -M [°C]	N-M (6)	T <sub>A</sub> -P [°C]	N-P	Publikace
Pc A115	buňňák světlenohý	62	2	55,5 56,3	10 (83)	Hardesty <i>et al.</i> , 2013
Pc B109		66	2	57,2 57,4	5 (79)	
Pc D103	buňňák havajský	53	3	58,7	6 (84)	Welch <i>et Fleischer</i> , 2011
Ptero02		63	4	53	5 (12)	
Ptero09	buňňák baleárský	62	3	53	7 (12)	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
Puff G2C		55	2	50	7 (50)	
Calex-01	kulík mořský	69	2	62	10 (42)	Küpper <i>et al.</i> , 2007
RBG18M	racek novozélandský	60	2	53	5 (12)	Welch <i>et Fleischer</i> , 2011

Legenda: \*- u lokusu není autory zmíněna teplota *annealingu*

V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci byly testovány v mnoha pracích páry mikrosatelitních primerů navržených pro zástupce z řádu trubkonosí na zástupcích z kladu Aequorlornithes. Tyto práce budou dále srovnány s mojí prací.

U 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) provedla ve své diplomové práci Nedvěďová (2015) *cross-species* PCR amplifikaci s použitím 212 párů primerů, kdy detekovala 45 polymorfních lokusů s 2–5 alelami na lokus. V rámci mé bakalářské práce se shodovalo nejvíce polymorfních lokusů s touto prací, a to 16 lokusů.

Strejčková (2016) ve své bakalářské práci testovala 213 párů primerů pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a našla 50 polymorfních lokusů s 2–5 alelami na lokus. U polymorfního lokusu Puff G2C se v této práci autorce nepodařil určit počet alel, já jsem detekoval u tohoto lokusu 2 alely. V diplomové práci Strejčková (2018) testovala těchto 50 nalezených polymorfních lokusů na 30 jedincích pelikána karibského a 5 z těchto lokusů vyřadila z důvodu monomorfismu. Celkově autorka charakterizovala ve své diplomové práci 45 polymorfních lokusů s 2–11 alelami na lokus. Z těchto 45 polymorfních lokusů bylo 10 shodných s mnou nalezenými polymorfními lokusy u čápa simbila. Autorce se v diplomové práci podařil vyhodnotit již zmíněný lokus Puff G2C a detekovala u něj 3 alely.

V rámci své bakalářské práce hledala Macková (2021) polymorfní mikrosatelitní lokusy u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace s využitím 213 párů primerů. Celkem detekovala 22 polymorfních lokusů s 2–5 alelami na lokus, kdy 10 z těchto lokusů bylo také polymorfních u čápa simbila. Lokusy De33 a Ptero08 se autorce nepodařilo amplifikovat. Při mém testování byly tyto dva lokusy monomorfní.

Zlochová (2019) ve své diplomové práci retestovala na 22 jedincích plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) 64 mikrosatelitních lokusů. 48 z nich označila dříve Kůrová (2017) jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a zbylých 16 vyhodnotila Strejčková (2018) jako polymorfní u 30 jedinců plameňáka karibského. Z těchto 64 retestovaných lokusů bylo 43 polymorfních s 2–13 alelami na lokus. Lokus Pc D3 vykazoval 2 polymorfní oblasti, tedy autorka detekovala celkem 44 polymorfních oblastí, kdy 9 z nich se shodovalo s polymorfními lokusy nalezenými v této bakalářské práci.

Hudzieczková (2019) se ve své bakalářské práci zabývala *cross-species* PCR amplifikací u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) s použitím 213 párů mikrosatelitních primerů, přičemž našla 46 polymorfních lokusů s 2–6 alelami na lokus. Těchto 46 lokusů bylo retestováno v diplomové práci Adámková (2021) na 21 nepříbuzných jedincích pelikána bílého a našla 36 polymorfních lokusů s 2–7 alelami na lokus, kdy 8 z těchto polymorfních lokusů bylo stejných jako v této práci u čápa simbila.

U 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Mycteria leucocephala*) provedla ve své bakalářské práci Kopečná (2018) *cross-species* PCR amplifikaci s použitím 213 párů primerů, kdy detekovala 24 polymorfních lokusů s 2–3 alelami na lokus. Tyto polymorfní lokusy dále autorka retestovala ve své diplomové práci (Kopečná, 2020) na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického a k tomu také ještě otestovala na těchto jedincích 12 lokusů, které označila ve své bakalářské práci Adámková (2019) za polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Bylo tedy celkem retestováno 36 lokusů, kdy 34 z nich bylo polymorfních s 2–5 alelami na lokus. 8 z těchto lokusů byly také v mé práci označeny jako polymorfní.

Krňávková (2021) se ve své bakalářské práci zabývala *cross-species* PCR amplifikací u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého (*Ciconia ciconia*) s použitím 213 párů

mikrosatelitních primerů, přičemž našla 18 polymorfních lokusů s 2–6 alelami na lokus, kdy pouze 6 z těchto lokusů se shodovalo s mnou nalezenými polymorfními lokusy.

Kolegyně z laboratoře mi poskytla experimentální data (Musilová, osobní sdělení), kdy hledala polymorfní mikrosatelitní lokusy u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého (*Ciconia nigra*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace s použitím 213 párů primerů. Nalezla 16 polymorfních lokusů s 2 až 4 alelami na lokus, z nichž 6 bylo shodně polymorfních s lokusy u čápa simbila. Také se jí nepodařilo amplifikovat lokus Pc D103, který byl při mém testování polymorfní s 3 alelami.

Ve své bakalářské práci hledala Janušová (2015) polymorfní mikrosatelitní lokusy u 6 nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace a celkem našla 20 polymorfních lokusů. Následně tyto lokusy charakterizovala ve své diplomové práci (Janušová, 2017) na 13 jedincích potápky roháče. 17 z těchto lokusů bylo označeno jako polymorfní s 2–12 alelami na lokus a 4 z nich shodně vykazovaly polymorfismus jako u nalezených lokusů v této práci.

U 6 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) provedla ve své bakalářské práci Verešová (2018) *cross-species* PCR amplifikaci s použitím 213 párů primerů, kdy detekovala pouze 12 polymorfních lokusů s 2–3 alelami na lokus. Poté autorka ve své diplomové práci (Verešová, 2020) testovala tyto polymorfní lokusy na 41 jedincích pelikána kadeřavého a 11 z nich bylo polymorfních s 2–3 alelami na lokus. V rámci mé bakalářské práce se shodovalo nejméně polymorfních lokusů s touto prací, a to 3 lokusy.

Ve srovnání s 26 polymorfními mikrosatelitními lokusy nalezenými v mé bakalářské práci u čápa simbila s ostatními druhy z kladu Aequorlitorornithes, u kterých byly také pomocí *cross-species* PCR amplifikace hledány polymorfní mikrosatelitní lokusy s použitím párů primerů polymorfních lokusů popsanych u druhů z řádu trubkonosí, byl zjištěn největší průnik shodných polymorfních lokusů s nesytem indomalajským, poté s plameňákem karibským, pelikánem skvrnozobým, plameňákem růžovým, pelikánem bílým, pelikánem africkým, čápem bílým a černým a potápkou roháčem. Nejmenší průnik v rámci polymorfních lokusů nalezených v této práci byl s pelikánem kadeřavým. Za zmínku stojí velmi malá shoda u čápa bílého a černého i přesto, že pochází ze stejného rodu *Ciconia*. Srovnání mých nalezených polymorfních mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila s testovanými lokusy u zmíněných 10 druhů je uvedeno v Tabulce č. 10.

**Tabulka č. 10:** Srovnání polymorfních mikrosatelitních lokusů z řádu trubkonosí, které byly pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovány u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila (tato práce) a současně byly polymorfní u nesytá indomalajského (Nedvědová, 2015), plameňáka karibského (Strejčková, 2018), pelikána skvrnozobého (Macková, 2021), plameňáka růžového (Zlochová, 2019), pelikána bílého (Adámková, 2021), pelikána afrického (Kopečná, 2020), čápa bílého (Krňávková, 2021), čápa černého (Musilová, nezveřejněná data), potápky roháče (Janušová, 2017) a pelikána kadeřavého (Verešová, 2020). Číslem je označen počet alel, M - monomorfní lokus, NA - neúspěšně amplifikovaný lokus a číslem v závorce počet testovaných jedinců.

Mikrosatelitní lokus	Čáp simbil (6)	Nesyt indomalajský (6)	Plameňák karibský (30)	Pelikán skvrnozobý (6)	Plameňák růžový (22)	Pelikán bílý (21)	Pelikán africký (12)	Čáp bílý (6)	Čáp černý (6)	Potápka roháč (13)	Pelikán kadeřavý (41)
Omn8	6	4	7	4	8	7	4	6	3	9	M
BFAL4	2	2	2	2	2	2	2	M	M	M	2
Pc B109	2	M	4	2	3	3	2	M	M	12	M
Pacbel_07265	2	2	3	2	2	M	M	5	M	M	M
Pc D103	3	2	3	M	2	M	M	3	NA	2	M
Calex-01	2	M	M	2	2	3	M	M	3	M	3
Paequ8	2	4	3	M	M	2	3	M	M	M	M
Patbel2	4	5	M	3	M	5	2	M	M	M	M
De3	4	4	4	M	3	M	M	M	M	M	M
STAL18	3	2	M	2	M	M	2	M	M	M	M
Omn2	2	2	M	2	M	M	2	M	M	M	M
Bb21	2	M	M	2	M	M	M	M	M	7	2
Ptero09	3	2	M	M	M	4	M	4	M	M	M
Puff G2C	2	3	3	M	M	M	M	3	M	M	M

**Tabulka č. 10:** Pokračování.

Mikrosatelitní lokus	Čáp simbil (6)	Nesyt indomalajský (6)	Plameňák karibský (30)	Pelikán skvrnozobý (6)	Plameňák růžový (22)	Pelikán bílý (21)	Pelikán africký (12)	Čáp bílý (6)	Čáp černý (6)	Potápka roháč (13)	Pelikán kadeřavý (41)
11H7	2	2	M	M	M	M	M	M	4	M	M
Ole19	4	M	M	2	M	2	M	M	M	M	M
Ole21	2	M	M	M	4	M	2	M	M	M	M
Omn25	3	2	M	M	M	M	M	M	2	M	M
Pacbel_17944	2	M	4	M	6	M	M	M	M	M	M
Pacbel_19907	2	2	M	M	M	M	M	M	2	M	M
Ptero02	4	5	M	M	M	M	M	4	M	M	M
Pacbel_16989	2	M	M	M	M	M	M	M	3	M	M
Patbel1	2	M	4	M	M	M	M	M	M	M	M
Pc A115	2	2	M	M	M	M	M	M	M	M	M
Ole10	2	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
RBG18M	2	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci byla genomická DNA čápa simbila testována dohromady v 5 pracích (Nevimová, 2012; Novosadová, 2012; Fišerová, 2014, Košatová, 2020 a tato práce). Celkem u něj bylo testováno 733 mikrosatelitních lokusů, z nichž 96 vykazovalo polymorfismus, tedy úspěšnost nalezení polymorfního lokusu je 13,1 %. Testované mikrosateltní páry primerů byly navrženy pro polymorfní lokusy pro druhy z řádů: čápi (Ciconiiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes), faetoni (Phaethontiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), terejové (Suliformes), tučňáci (Sphenisciformes) a veslonozí (Pelecaniformes). Také byly testovány na čápu simbilovi páry primerů pro univerzální ptačí mikrosatelitní lokusy. Z celkových 96 polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila se podařilo jich 45 plně charakterizovat na 10 nepříbuzných jedincích v práci Fišerová (2014). U zbylých 51 polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila by bylo dobré provést v budoucnu plnou charakterizaci. Také by bylo vhodné v nadcházející době otestovat zbylé mikrosatelitní páry primerů, které byly popsány v publikacích pro řády čápi a dlouhokřídli a nalézt další polymorfní lokusy u čápa simbila.



## 7 Závěr

V rámci mé bakalářské práce jsem pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace hledal polymorfní mikrosatelitní lokusy u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila. Celkově jsem otestoval 213 párů mikrosatelitních primerů, z nichž bylo 207 párů dříve popsáno u druhů z řádu trubkonosí, konkrétně 53 u čeledi albatrosovití, 54 u čeledi buňňáčkovití a 100 u čeledi buňňákovití. Dalších 5 párů primerů bylo popsáno u zástupců z řádu dlouhokřídlí, a to u alkouna holubího, kulíka mořského a racka novozélandského, a poslední pár u lesňáčka žlutohého pocházejícího z řádu pěvců. Těchto posledních 6 párů primerů bylo úspěšně testováno pomocí *cross-species* PCR amplifikace u některých druhů z řádu trubkonosí a poskytovaly u nich polymorfní produkty.

U čápa simbila jsem pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace úspěšně amplifikoval všech 213 mikrosatelitních lokusů, kdy bylo 26 polymorfních a zbylých 187 monomorfních. V první části testování byly všechny lokusy amplifikovány při teplotě *annealingu* 50 °C, poté při poskytnutí slabého produktu byla snižována tato teplota až na 44 °C, naopak při silném produktu byla tato teplota zvyšována až na 69 °C. Pro všechny nalezené polymorfní lokusy byla určena teplota *annealingu*, délka elektroforetické separace, počet alel a genotypy šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. Největší počet alel na lokus byl detekován u lokusu Omn8, u kterého jsem našel 6 alel. U zbylých polymorfních lokusů jsem detekoval 2–4 alely na lokus.

Celkem jsem našel 24 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly popsány u zástupců z řádu trubkonosí, kdy pocházely 4 lokusy z čeledi albatrosovití, 6 z čeledi buňňáčkovití a 14 z čeledi buňňákovití. Poslední 2 nalezené polymorfní mikrosatelitní lokusy byly popsány u zástupců z řádu dlouhokřídlí, a to u kulíka mořského a racka novozélandského. Nejvíce nalezených polymorfních lokusů pro jeden druh pocházelo od buňňáka útlozobého, kde jich bylo detekováno celkem 6.

## 8 Literatura

- Adámková, V. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Adámková, V. (2021): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*. Manuskript [online]; [navštíveno 10. 4. 2022] Dostupné z <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>.
- Armour, J. A. L., Neumann, R., Gobert, S., Jeffreys, A. J. (1994): Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3, 599–605.
- 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.
- Bennett, P. (2000): Demystified...Microsatellites. *Molecular Pathology* 53, 177–183.
- Bicknell, A. W. J., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Knight, M. E., Bilton, D. T., Votier, S. C. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's stormpetrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). *Conservation Genetics Resources* 3, 711–716.
- Bried, J., 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.
- 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 [online]; [navštíveno 9. 4. 2022] Dostupné z <https://www.yumpu.com/en/document/view/39976169>

- Brown, L. H., Urban, E. K., Newman, K. (1993): The birds of Africa. Vol. 1, Academic Press, London, 172–190.
- Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009): Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology* 150, 925–929.
- Burg, T. M., (1999) Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology* 8, 338–341.
- Burg T. M., Croxall J. P. (2001): Global relationships amongst black-browed and grey-headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. *Molecular Ecology* 10, 2647–2660.
- Burg T. M., Croxall J. P. (2004): Global population structure and taxonomy of the wandering albatross species complex. *Molecular Ecology* 13, 2345–2355.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity* 79, 506–514.
- Dubois M. P., Jarne P., Jouventin P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes* 5, 905–907.
- del Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J. (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona, 436–465.
- Ellegren, H. (1992): Polymerase-Chain-Reaction (PCR) Analysis of Microsatellites: A New Approach to Studies of Genetic Relationships in Birds. Oxford University Press, 886–895.
- Ellegren, H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5, 435–445.
- 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.

- Gaisler, J., Zima, J. (2018): Zoologie obratlovců. Vydání 3., přepracované. Academia, Praha, 463–488.
- Galbusera, P., van Dongen, S., Matthysen, E. (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1, 163–168.
- Gill, F., Donsker, D. (2022): IOC World Bird list (v12.1) [online]; [navštíveno 15. 3. 2022] Dostupné z <https://www.worldbirdnames.org/bow/storks/>.
- Goldstein, D. B., Pollock, D. D. (1997): Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. *The Journal of Heredity* 88, 335–342.
- Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwaters, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources* 9, 1044–1046.
- Hamilton, M. B., Pincus, E. L., Di Fiore, A., Fleischer R. C. (1999): Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* 27, 501–507.
- Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2013): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources* 5, 27–29.
- Hernandez, L. D., Lounsbury, 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.
- Hudec, K., Šťastný, K., Cepák, J., Čihák, K., Honza, M., Hořák, D., Hromádka, M., Klvaňa, P., Musil, P., Musilová, Z. (2016): Ptáci - Aves. Díl I. Vydání 3., přepracované a doplněné. Academia, Praha, 577–579.
- 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.

- Ishibashi, Y., Mikami, O., Abe, S. (2000): Isolation and characterization of microsatellite loci in the Japanese marsh warbler *Locustella pryeri*. *Molecular Ecology* 9, 373–375.
- 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.
- Jarne, P., Lagoda, P. J. L. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11, 424–429.
- Kahl, M. P. (1971): Social behavior and taxonomic relationships of the storks. *Living Bird* 10, 151–170.
- Kahl, M. P. (1972): Comparative ethology of the Ciconiidae. The Wood Stork (genera *Mycteria* and *Ibis*). *Ibis* 114, 25–29.
- Kahl, M. P. (1979): Family Ciconiidae: 'Peter Check List of Birds of the World'. Vol. 2 (Mayr, E., Cottrell, G. W. Eds). Museum of Comparative Zoologie, Cambridge.
- 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.
- Košatová, K. (2020): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Bakalářská 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.

- 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. Disertační práce. Auckland, Nový Zéland, Massey University [online]; [navštíveno 10. 4. 2022] Dostupné z <http://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>.
- 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.
- Malausa, T., Gilles, A., Megléc, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., Dubut, V., Pech, N., Catagnone-Sereno, P., Délye, C., Feau, N., Frey, P., Gauthier, P., Guillemaud, T., Hazard, L., Le Corre, V., Lung-Escarmant, B., Malé, P. J. G., Ferreira, S., Martin, J. F. (2011): High throughput microsatellites isolation through 454 GS-FLX titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources* 11, 638–644.
- 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.
- Nedvěďová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Neff, B. D., Gross, M. R. (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55, 1717–1733.
- 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.

- Novosadová, E. (2012): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu veslonoží a plameňáci u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). 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.
- Piertney, S. B., Marquiss, M., Summers, R. (1998): Characterization of tetranucleotide microsatellite markers in the Scottish crossbill (*Loxia scotica*). *Molecular Ecology* 7, 1247–1263.
- 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.
- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo, J. U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36, 348–360.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted nextgeneration DNA sequencing. *Nature* 526, 569–573.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology* 153, 367–373.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener, S., Krawetz, S. A.: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, 365–386.
- Sheldon, F. H., Slikas, B. (1997): *Advances in Ciconiiformes Systematics 1976–1996*. *Colonial Waterbirds* 20, 106–114.
- Sia, E. A., Butler, C. A., Dominska, M., Greenwell, P., Fox, T. D., Petes, T. D. (2000): Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 250–255.

- Slikas, B. (1997): Phylogeny of the avian family Ciconiidae (Storks) based on cytochrome b sequences and DNA-DNA hybridization distances. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8, 275–300.
- Slikas, B. (1998): Recognizing and Testing Homology of Courtship Displays in Storks (Aves: Ciconiiformes: Ciconiidae). *Society for the Study of Evolution*, 884–893.
- 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.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463–6471.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004) Characterization of microsatellite loci in Whitechinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-species amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes* 4, 33–35.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10, 967–981.
- 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.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources* 3, 581–584.



- Winkler, D. W., Billerman, S. M., Lovette, I. J., Pegan, T. M., Atkins, N. (2015): Bird families of the world: an invitation to the spectacular diversity of birds. Lynx Edicions, Barcelona, 23, 173.
- Zlochová, A. (2019): Amplifikace vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.