

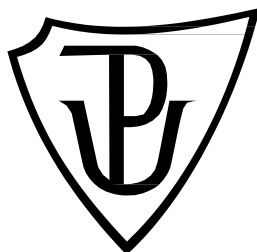
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Tereza Gajdošíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci
a konzervovaných ptačích mikrosatelitů
u čápa bílého (*Ciconia ciconia*)**

Bakalářská práce

Tereza Gajdošíková

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Tereza GAJDOŠÍKOVÁ
Osobní číslo: R16703
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*).
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce. 2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů. 3. PCR amplifikace DNA čápa bílého s využitím cross-species primerů pro ptáky z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1) Prum, R.O. et al. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569-573. 2) 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) Vivianna, 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 Nádvořík, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Tereza Gajdošíková

Název práce: *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*)

Typ práce: bakalářská

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

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

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: brodiví, *Ciconia ciconia*, čáp bílý, mikrosatelity, *cross-species* PCR amplifikace

Počet stran: 45

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Souhrn

V teoretické části jsem se nejprve věnovala taxonomickému zařazením řádu brodiví do systému ptáků a jak se tento systém v minulosti vyvíjel. Uvedla jsem bližší charakteristiku řádu brodiví, čeledi čápoovití a čápa bílého jako testovaného druhu. Dále jsem se věnovala obecné charakteristice mikrosatelitů jako takových, mikrosatelitům z řádu tučňáci a univerzálním ptačím mikrosatelitům. V poslední části jsem popsala způsoby hledání mikrosatelitových lokusů se zaměřením na *cross-species* PCR amplifikaci.

V praktické části jsem testovala polymorfismus mikrosatelitových lokusů na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého s využitím 173 párů primerů, z nichž 113 bylo od zástupců z řádu tučňáci, 36 párů primerů bylo navržených pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů navržených pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Těmito páry primerů jsem u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého detekovala celkem 19 polymorfních lokusů, z toho 9 polymorfních mikrosatelitů bylo navrženo pro mikrosatelity 6 druhů tučňáků a po 5 polymorfních mikrosatelitech navržených pro EST ptačí mikrosatelity a pro konzervované ptačí mikrosatelity.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Tereza Gajdošíková

Title: *Cross-species* amplification of microsatellites from Sphenisciformes and conserved avian microsatellites in White Stork (*Ciconia ciconia*)

Type of thesis: bachelor

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

Supervisor: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Keywords: Ciconiiformes, *Ciconia ciconia*, White Stork, microsatellites, *cross-species* PCR amplification

Number of pages: 45

Number of appendices: 0

Language: czech

Summary

In the Theoretical Part, I commenced with the taxonomic categorization of the order Ciconiiformes into the avian system and its historical development. The closer characterisations of the order Ciconiiformes, Ciconiidae and White Stork respectively were provided. Furthermore, microsatellites in general, microsatellites in Sphenisciformes and universal avian microsatellites were characterised. In the last chapter, the methods for finding polymorphic microsatellite loci with the focus on *cross-species* PCR amplification were described.

In the Practical Part, I examined the polymorphism of microsatellite loci on genome DNA of 6 non-relative White Storks using 173 pairs of primers. Out of the 173 primers, 113 pairs were extracted from the order of Sphenisciformes, 36 pairs were intended for the amplification of EST avian microsatellites and 24 pairs were intended for the amplification of conserved avian microsatellites. Using the aforementioned pairs of primers, I detected an overall 19 polymorphic loci in 6 non-related White Storks. The 19 identified polymorphic loci consisted of 9 polymorphic microsatellites from the group of microsatellites of 6 Penguin species, 5 polymorphic microsatellites designed for EST avian microsatellites and 5 polymorphic microsatellites designed for conserved avian microsatellites.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 24. 7. 2020

.....
podpis

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho čas a pomoc při zpracování výsledků experimentální části práce. Děkuji mu také za odborné, cenné rady a připomínky, které mi během psaní bakalářské práce poskytoval. Také bych chtěla poděkovat mému kamarádovi Davidu Lingovi, který mi pomohl s tvorbou kladogramů.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Systém a fylogeneze řádu brodiví.....	3
3.2	Řád brodiví.....	6
3.3	Čeled' čápovití	7
3.4	Čáp bílý	8
3.4.1	Výskyt čápa bílého.....	8
3.4.2	Rozmnožování a hnízdění čápa bílého	8
3.4.3	Péče o mláďata a potrava čápa bílého.....	9
3.4.4	Migrace čápa bílého.....	10
3.4.5	Ochrana čápa bílého.....	10
3.5	Mikrosatelity	10
3.6	Ptačí mikrosatelity	11
3.6.1	Mikrosatelity od druhů z řádu tučňáci	11
3.6.2	Univerzální ptačí mikrosatelity.....	13
3.7	Hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů.....	14
3.7.1	Hledání mikrosatelitových lokusů <i>de novo</i>	14
3.7.2	<i>Cross-species</i> PCR amplifikace.....	14
4	Materiály a metody	16
4.1	Biologický materiál.....	16
4.2	Použité chemikálie a roztoky	16
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	18
4.4	PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů	19
4.5	Elektroforetická separace	21
5	Výsledky.....	25
6	Diskuze.....	32
7	Závěr	39
8	Seznam použité literatury	40

Seznam obrázků

Obrázek 1: Zařazení řádu brodiví do systému dle Zhang *et al.* (2012).

Obrázek 2: Klad Aequorlitornithes dle Prum *et al.* (2015).

Obrázek 3: Zařazení řádu brodiví do systému dle Burleigh *et al.* (2015).

Obrázek 4: Hnízdící pár čápa bílého.

Obrázek 5: Graf rozdělení 19 polymorfních mikrosatelitových lokusů podle příslušných zdrojových druhů, ze kterých byly izolovány.

Obrázek 6: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitového lokusu Em14.

Obrázek 7: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitového lokusu Em8.

Obrázek 8: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitového lokusu TG01-124.

Obrázek 9: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitového lokusu TG13-017.

Seznam tabulek

Tabulka 1: Klasifikace řádu tučňáci do jednotlivých rodů podle Bradford (2014).

Tabulka 2: Seznam testovaných mikrosatelitových lokusů pocházejících z řádu tučňáci.

Tabulka 3: Seznam testovaných EST ptačích mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Tabulka 4: Složení PCR mixu pro 6 vzorků.

Tabulka 5: Základní teplotní a časový program PCR reakce.

Tabulka 6: Charakteristika 19 párů primerů a jimi amplifikovaných 19 polymorfních lokusů testovaných na 6 nepříbuzných jedincích čápa bílého.

Tabulka 7: Genotypy 19 polymorfních mikrosatelitů amplifikovaných na DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého.

Tabulka 8: Srovnání polymorfních mikrosatelitových lokusů pocházejících z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity, které byly testovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého a dalších 5 prací, které použily DNA dalších druhů ptáků pocházejících z kladu Aequorlitorornithes.

Tabulka 9: Seznam 14 nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého v diplomové práci Burianová (2011).

Tabulka 10: Seznam 5 nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého v diplomové práci Fišerová (2014).

1 Úvod

Mikrosatelity jsou sekvence repetitivní DNA, které se skládají z krátkých, tandemově se opakujících jednotek mnohokrát za sebou. Ačkoliv se mikrosatelity běžně vyskytují v genomech prokaryot i eukaryot ve velkém množství, jejich biologická funkce je v mnoha ohledech nejasná. Nicméně pro své unikátní vlastnosti, jako jsou zejména poměrně snadná detekce s využitím PCR techniky, vysoká variabilita v počtu a délce opakujících se jednotek a z toho vyplývající vysoký stupeň polymorfismu, jsou často vyhledávanými nástroji pro molekulárně-biologické studie.

Čáp bílý (*Ciconia ciconia*) je jedním z nejznámějších zástupců řádu brodivých na našem území. Je typický svým černo-bílým zbarvením a každému se dostává do povědomí už od útlého dětství. Doposud vyšly dvě publikace, které popsaly nové mikrosatelitové lokusy pro tento druh. V Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci je tento druh již mnoho let studován a tato práce by v budoucnu mohla přispět k dalšímu nalezení mikrosatelitů pro tento druh, které by bylo dále možné využít jako genetické markery nejen pro studium příbuzenských vztahů.

V této bakalářské práci budu s využitím metody *cross-species* PCR amplifikace testovat mikrosatelitové lokusy u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého. Bude otestováno 36 párů primerů navržených pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů, 24 párů primerů navržených pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů a 113 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitů 9 druhů z řádu tučňáci (Sphenisciformes).

2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
3. PCR amplifikace DNA čápa bílého s využitím *cross-species* primerů pro ptáky z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

3 Literární přehled

3.1 Systém a fylogeneze řádu brodiví

Řád brodiví (Ciconiiformes) není neměnnou skupinou. V posledních přibližně 50 letech je tento řád tradičně vnímán jako skupina ptáků zahrnující čeledi volavkovití (Ardeidae), čápoovití (Ciconiidae), ibisovití (Threskiornithidae), člunozobcovití (Balaenicipitidae) a kladivoušovití (Scopidae). Nicméně v posledních 30 letech došlo ke kompletní změně taxonomického zařazení velkých vodních ptáků. Největší změny nastaly v kompletní přestavbě a vzájemném promíchání čeledí řádu brodiví a veslonoží (Pelecaniformes).

Konstrukce a pochopení příbuzenských vztahů je obecně pro evoluční biology od dob Darwina hlavní výzvou. Ve schopnostech odvodit strukturu fylogenetických stromů byly v průběhu času zaznamenány pokroky v technologii sekvenování DNA, fylogenetických algoritmech a vysoce výkonném počítačovém zpracování (Delsuc *et al.*, 2005), které umožnily generování rozsáhlých fylogenetických studií (Soltis *et al.*, 2013). Zdokonalování fylogenetických stromů z předešlých fylogenetických stromů, aby nedošlo ke ztrátě přesnosti nebo kvality odhadovaných fylogenetických stromů, však představuje pro evoluční biology stále velkou výzvu.

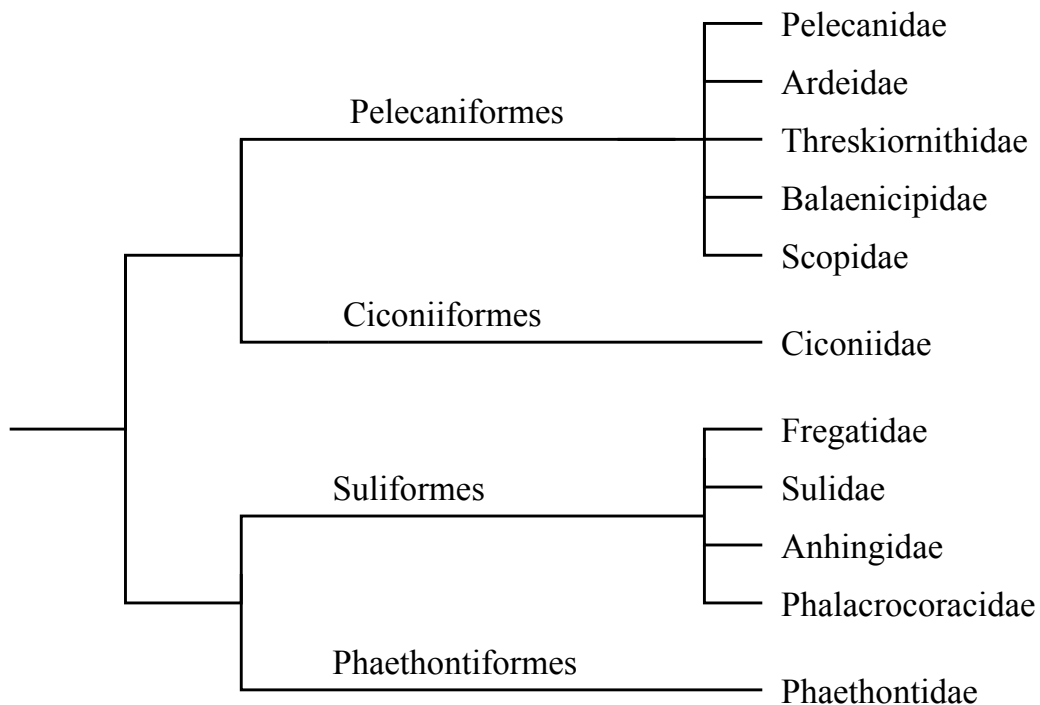
Ahlquist *et Sibley* (1987) publikovali molekulárně-biologickou klasifikaci řádu brodiví založenou na DNA-DNA hybridizaci. Studie přinesla další způsob, jak přistoupit ke klasifikaci třídy ptáků, neboť vycházela z porovnání DNA jednotlivých druhů ptáků. V tomto pojetí je na řád brodiví chápán jako součást nadřádu Passerimorphae, do kterého patří podřády Charadrii (bahňáci) a Ciconii (čápi).

Proctor *et Lynch* (1993) také zveřejnili další studii založenou na DNA-DNA hybridizaci. Jímí vytvořený systém vznikl na základě zkoumání podobnosti genomů jednotlivých ptáků. Podle tohoto pojetí je na zástupce z řádu brodivých nahlíženo jako na součást nadřádu Passerimorphae, stejně jako předpokládali Ahlquist *et Sibley* (1987). Řád brodiví byl ale značně rozšířen o celou řadu stávajících řádů, které se tímto zrušily a tím se odlišily od systémů založených na morfologických znacích. Ke stávajícím zástupcům řádu brodiví bylo přidáno mnoho již existujících řádů, jako jsou Charadriiformes (dlouhokřídli), Gaviiformes (potáplice), Falconiformes (dravci), Pelecaniformes (veslonoží), Podicipediformes (potápky), Procellariiformes (trubkonosí), Phoenicopteriformes (plameňáci) a Sphenisciformes (tučňáci) (Proctor *et Lynch*, 1993).

Příbuznost brodivých, na základě anatomických znaků, se zástupci Pelecaniformes (veslonozi), Falconiformes (dravci) a Phoenicopteriformes (plameňáci) předpokládali i Hudec *et* Šťastný (1994).

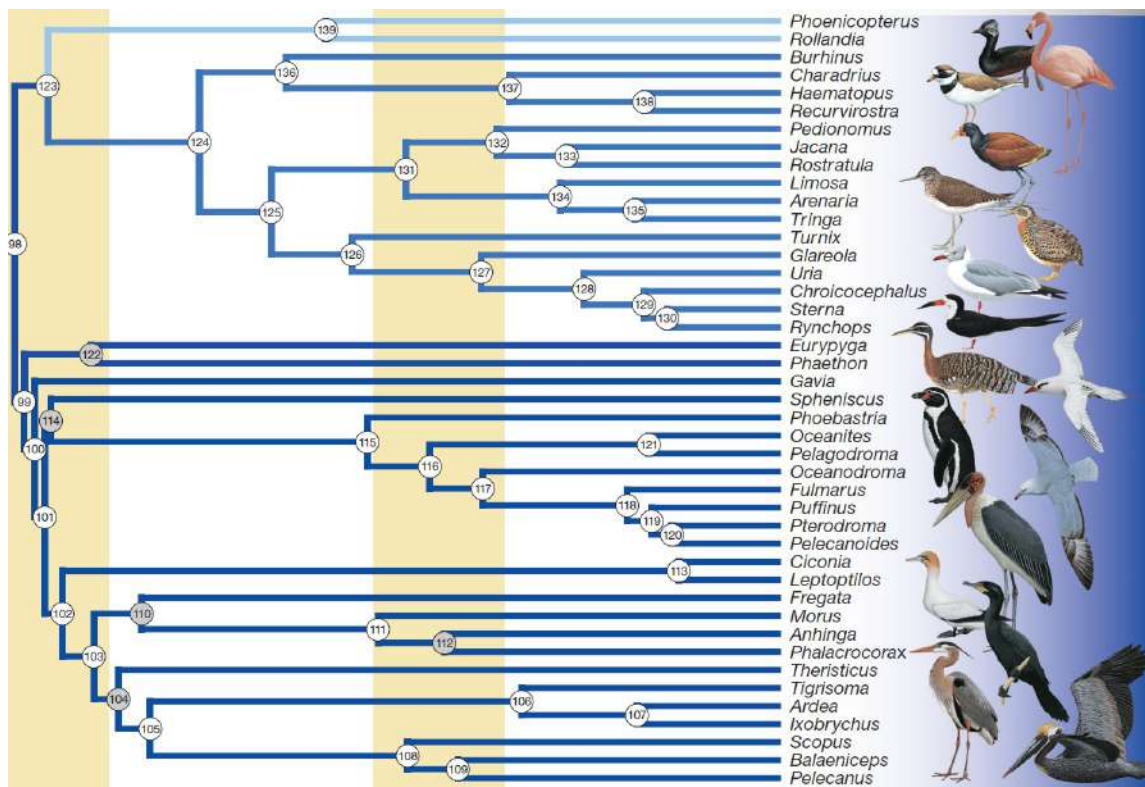
Řád brodiví byl původně po dlouhou dobu považován za monofyletickou skupinu. Od roku 1987 se začalo uvažovat o polyfyletickém charakteru, neboť od té doby bylo publikováno několik studií (Bledsoe 1987; Ahlquist *et* Sibley, 1987; Sibley *et al.*, 1987; Sheldon *et* Slikas, 1997 atd.). Polyfyletický charakter předpokládá i studie z nedávné doby. Podle týmu Zhang *et al.* (2012) řád brodiví (Ciconiiformes) obsahuje jedinou čeleď čápkovití (Ciconiidae). Čeledi pelikánovití (Pelecanidae), volavkovití (Ardeidae), ibisovití (Threskiornithidae), člunozobcovití (Balaenicipitidae) a kladivoušovití (Scopidae) byly odděleny a staly se součástí řádu veslonozí (Pelecaniformes). Kromě toho byli fregatkovití (Fregatidae), terejovití (Sulidae), anhingovití (Anhingidae) a kormoránovití (Phalacrocoracidae) odstraněni z Pelecaniformes a umístěni do nového řádu Suliformes, zatímco faetonovití (Phaethontidae) byli přesunuti do nového řádu Phaethontiformes (Obrázek 1).

Obrázek 1: Zařazení řádu brodiví do systému dle Zhang *et al.* (2012).



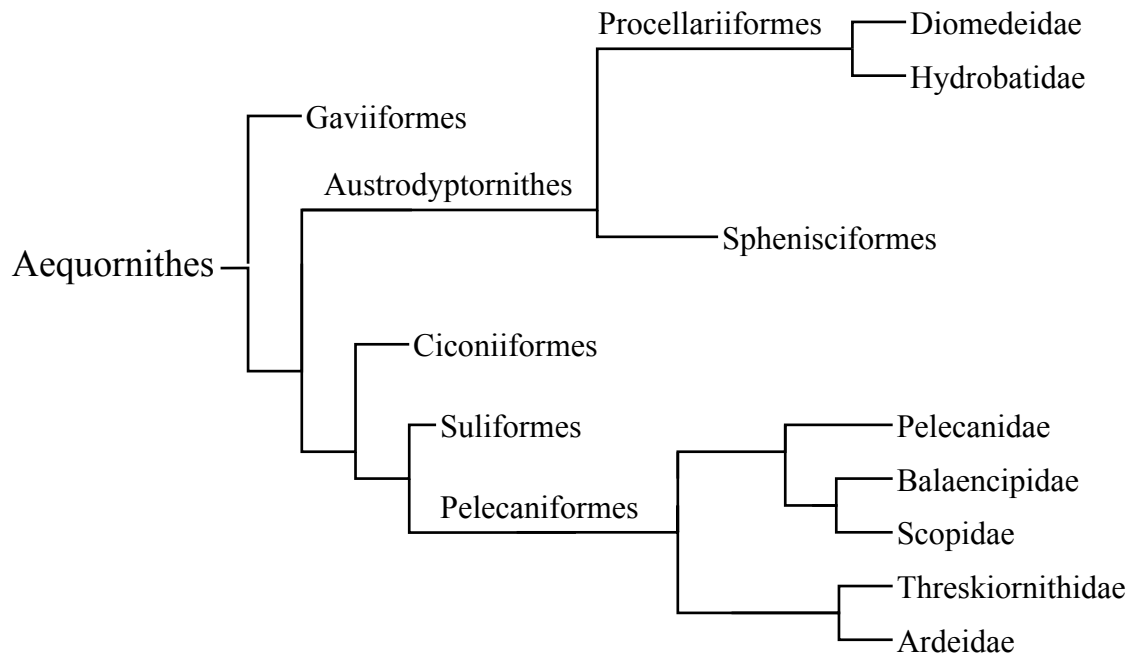
Prum *et al.* (2015) shromáždili data pro sestavení fylogenetického stromu kladu Neoaves, který dnes zahrnuje všechny moderní ptáky kromě Palaeognathae (běžci) a Galloanserae (hrabaví a vrubozubí). V tomto pojetí vymezují řád brodiví jako součást kladu vodních ptáků Aequorlithornithes, který se dělí na dvě sesterské skupiny (Obrázek 2). První skupinou jsou plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes) a dlouhokřídli (Charadriiformes). Do druhé skupiny patří slunatci (Eurypygiformes), faetoni (Phaethontiformes), potáplice (Gaviiformes), tučňáci (Sphenisciformes), trubkonosí (Procellariiformes), veslonoží (Pelecaniformes) a brodiví (Ciconiiformes).

Obrázek 2: Klad Aequorlithornithes dle Prum *et al.* (2015).



Tým Burleigh *et al.* (2015) vytvořil fylogenetický strom, který by měl sloužit pro budoucí srovnávací analýzy. Shromáždili dostupná molekulární data od ptáků, aby odvodili nový systém. Toto pojetí dělí Aequorlithornithes taktéž na dvě sesterské skupiny. Jednou skupinou jsou potáplice (Gaviiformes) a druhá skupina zahrnuje Austrodyptornithe, kam patří trubkonosí (Procellariiformes), tučňáci (Sphenisciformes), brodiví (Ciconiiformes), terejové (Suliformes) a veslonoží (Pelecaniformes) (Obrázek 3).

Obrázek 3: Zařazení řádu brodiví do systému dle Burleigh *et al.* (2015).



Studie Royara de Souza Oliviera *et al.* (2019) poskytla pohled na systematiku Ciconiidae (čápvití). V rámci studie byl proveden rozsáhlý výzkum, jehož cílem bylo podrobně porovnat a popsat kraniální osteologii vybraných druhů: marabu indický (*Leptoptilus dubius*), marabu africký (*L. crumeniferus*) a marabu indomalajský (*L. javanicus*). Tato studie podpořila dřívější hypotézu (Kahl, 1979) o rozdělení čeledi čápvitých na tři podčeledi: Mycteriini, Ciconiini a Leptoptilini. Tyto tři skupiny dnes tvoří řád Ciconiiformes.

3.2 Řád brodiví

Řád brodiví (Ciconiiformes) zahrnuje vesměs velké ptáky s dlouhýma nohama a výrazným dlouhým zobákem. Většina druhů má protáhlý, štíhlý a velmi ohebný krk (Hanzák, 1974). Tito ptáci se vyskytují hlavně ve sladkovodním prostředí s teplým klimatem, ale protože jsou vázáni k vodnímu prostředí, zimují v místech, kde nedochází k zamrznutí vodních ploch. Jejich tělesná přizpůsobení jim však nebrání žít i v jiných podmínkách než vodních, jako jsou suché stepi nebo lesy (Šťastný *et al.*, 1998). Jejich rozšíření je kosmopolitní s výjimkou polárních oblastí (Hanzák *et Hudec*, 1963). Spousta zástupců tohoto řádu se ocitla na seznamu kriticky ohrožených druhů. Jen některé druhy se dokázaly přizpůsobit změnám, které v krajině způsobil člověk (Hoare *et Burnie*, 2008).

Dlouhé nohy nevyužívají jen k získávání potravy z vody nebo bažinatých biotopů, ale také jim umožňují udržovat opeření v suchu, zatímco natahují svůj ohebný krk a hlavu k vodě. Někteří z nich mají dokonce mezi prsty plovací blány, které jim slouží k rozložení hmotnosti, když krácejí po bahnitém dně nebo ve vegetaci mokřin (Burnie, 2002). Pohybují se pomalu a rozvážně. Jestliže potřebují prchat, vzlétnou. Většina brodivých tak výborně létá, hlavně plachtí (statické plachtění) (Gaisler *et* Zima, 2018). Podle polohy krku během letu se mohou rozpoznat volavky, které za letu mají krk esovitě složen, naopak čápovití drží krk natažený dopředu (Svensson *et* Grant, 2004). K vyhledávání potravy využívají hlavně výborný zrak, kterým prozkoumávají vodu a hledají známky pohybu pod hladinou. K lovu využívají dlouhý zobák, jimž provedou rychlý výpad a kořist tak uloví, jen zřídka nabodnou. Některé druhy svou techniku lovu zlepšují. Například volavka černá využívá stínu svých roztažených křídel, do kterého láká ryby. Jejich nejčastější potravou jsou zejména ryby, obojživelníci, měkkýši či krabi. Ne všechny druhy však loví živou kořist, například čáp marabu se živí zdechlinami. Loví převážně samotářsky, aby si vzájemně neplašily potenciální kořisti (Burnie, 2002).

Obvykle žijí v monogamii (Hudec *et* Šťastný, 2016), nicméně ke spánku se shromažďují do skupin a mnohé druhy hnízdí v koloniích (Burnie, 2002). Staví zpravidla velká hnízda z větví a klacků, na stromech nebo v rákosinách, jednotlivě nebo v koloniích. Pak v nich hnízdí i řadu let a stále je přistavují (Gaisler *et* Zima, 2018). Mláďata se líhnou vidoucí, vyznačují se rychlým růstem, ale nikoliv schopností letu, v hnízdě zůstávají několik týdnů a starají se o ně oba rodiče (Hudec *et* Šťastný, 2016).

3.3 Čeled' čápovití

Zástupci čeledi čápovití (Ciconiidae) jsou většinou ptáci mohutnější postavy s dlouhýma nohama, poměrně krátkými prsty, esovitě stočeným, dlouhým krkem a silným, klínovitým, na špičce ze stran zploštělým zobákem. Některým druhům se zobák uprostřed nedovírá. Mají dlouhá, široká křídla a jsou vytrvalí letci. Jejich hlasové ústrojí je zakrnělé, bez hlasových svalů. Proto většina zástupců této čeledi nevydává zvuky. Projevují se pouze chraplavým syčením nebo častěji klapáním zobáku (Šťastný *et* Hudec, 2016). Pro čápy platí, že jsou v čekání na svou kořist neobyčejně trpěliví a vytrvalí. Potravu sbírají při volné chůzi na suchu nebo v mělké vodě. Živí se hlavně živočišnou potravou. Některé druhy si zvykly na člověka a svá hnízda proto stavějí v blízkosti lidských obydlí. Mezi nejznámější zástupce žijící v ČR patří čáp bílý (*Ciconia ciconia*) a čáp černý (*C. nigra*).

3.4 Čáp bílý

Čáp bílý (*Ciconia ciconia*) je snad nejpopulárnější divoce žijící evropský pták. Typické je pro něj bílé zbarvení těla, černě zbarvené konce křídel, červený zobák a nohy. Obě pohlaví jsou stejně zbarvena, samice však bývají zpravidla menší. Se svou průměrnou hmotností okolo 3,5 kg a rozpětím křídel až 2,2 m patří k největším zástupcům z řádu brodivých. Typickým zvukovým projevem je klapání zobáku, kterým se ozývá hlavně při setkání partnerů v hnízdě (Svensson *et* Grant, 2004).

3.4.1 Výskyt čápa bílého

Vyskytuje se hlavně v Evropě. Je rozšířen zejména ve střední a východní Evropě, na Balkáně a ve Španělsku (Kotouč, 2004). Ve východní Evropě je zatím hojný, v západní Evropě ubývá (Svensson *et* Grant, 2004). Také u nás početnost hnízdících párů poklesla (Gaisler *et* Zima, 2018). Na našem území hnízdí především v nížinách a ve středních polohách, zejména potom v rybníčných a bažinatých oblastech. Jeho nejčastějšími místy výskytu jsou vyvýšené body v údolí obklopené otevřenou krajinou (Šťastný *et* Hudec, 2016).

3.4.2 Rozmnožování a hnízdění čápa bílého

Čáp bílý pohlavně dospívá až třetím rokem života, hnízdit začíná však ve věku 4 až 6 let a ve volné přírodě se dožívá 8 až 14 let. Samice snáší do hnízda 3–5 čistě bílých vajec, ze kterých se po měsíci líhnou mláďata (Kotouč, 2004). Stavbu i opravu hnízda realizuje samec, každým rokem ho zdokonaluje, takže může dosahovat značných rozměrů (až více než 2 m na výšku s hmotností až 2 tuny). Mohutná hnízda (Obrázek 4) čápa bílého s oblibou využívají k hnízdění i jiní ptáci. Nejčastěji jsou zde k spatření kolonie vrabců polních a domácích nebo kolonie špačků obecných (Cepák *et al.*, 2014). Svá hnízda staví z klacíků, hlíny a trávy v blízkosti lidských obydlí, zejména na střechách, kostelních věžích, komínech a elektrických sloupech (Svensson *et* Grant, 2004). V posledních desetiletích se však strategie hnízdění čápa bílého drasticky změnila: klesá počet jedinců hnízdících na tradičních lokalitách, zatímco preference hnízdění na elektrických sloupech výrazně stoupá. Podle výzkumu Gyalus *et al.* (2018), provedeného v Maďarsku, byl od roku 2000 výrazný posun k preferenci hnízdění na elektrických stožárech, navzdory hojnosti prázdných potenciálních stanovišť k hnízdění mimo elektrické vedení. Osídlování sloupů s elektrickým vedením bylo prokázáno stejným tempem v každém kraji, nezávisle na podílu původních lokalit

k hnízdění. S tím se však pojí fakt vysokého procenta úhynů čápů z důvodu nárazu právě na dráty elektrického vedení (Cepák *et al.*, 2014).

Obrázek 4: Hnízdící pár čápa bílého. (Foto: Tomáš Bělka)



3.4.3 Péče o mláďata a potrava čápa bílého

Po vylíhnutí rodiče na svých mláďatech ještě po určitou dobu sedí a chrání je tak před přímým sluncem i před deštěm. Jeden z rodičů vysedává na hnízdě, druhý shání potravu. Přinesenou potravu rodiče vyvrhují do hnízda a mláďata si ji sama berou. Toto střídání probíhá o frekvenci co dvě hodiny a trvá obvykle 17 dní. Po zhruba 22 dnech od vylíhnutí mláďat samec hnízdo opouští. Samice tak činí až po měsíci (Hanzák *et* Hudec, 1963). Přibližně po 65 dnech se mláďata osamostatňují. V období sucha mohou čápata v hnízdech hladovět. Nejmladší mládě, které bývá zpravidla nejmenší, přestane loudit potravu od rodičů a zeslábne. Rodiče takové mládě, které se nechová jako ostatní, přestanou považovat za své. Živé nebo mrtvé jej vyhodí z hnízda (Hanzák *et* Hudec, 1963).

Nejčastější složkou potravy jsou žáby, příležitostně loví mloky, čolky, hady, ještěrky, mladé ptáky, krtek, ryby a velký hmyz (Hanzák *et* Hudec, 1963). Často hledají potravu na oraných polích (Dungel *et* Hudec, 2001), takže významnou složkou potravy jsou i hraboši. Šestičlenná čapí rodina spotřebuje denně asi 4 kg potravy (Hanzák *et* Hudec, 1963).

3.4.4 Migrace čápa bílého

Jedná se o typicky stěhovavého ptáka, který je denním migrantem táhnoucím ve větších skupinách, čítajících až stovky ptáků. Po zavedení kroužkování toho víme o jeho migračních trasách mnohem více než o stěhování ostatních ptáků. Evropské ptáci migrují dvěma hlavními tahovými cestami: západní a východní trasou. Čápi hnízdící v západní Evropě nejčastěji táhnou přes Francii, Španělsko, přelétají Gibraltarskou úžinu a širokou frontou táhnou přes Maroko, Alžírsko nebo Tunisko do západní Afriky. Východní migrační trasa, pro čápy hnízdící naopak ve východní Evropě, směřuje z Evropy přes Turecko, Sýrii, Jordánsko, přelétají přes Rudé moře, odkud táhnou do východní a jihovýchodní Afriky (Cepák *et al.*, 2014). Svá sezonní útočiště obvykle začínají opouštět koncem léta (Kotouč, 2004) a vracejí se začátkem jara (Hanzák *et Hudec*, 1963). Při překonávání velkých vzdáleností se pohybují především pomocí plachtění za využití stoupavých teplých proudů vzduchu nad pevninou. Nad mořem tyto vzdušné proudy chybí, proto ptáci moře oblétají nad pevninou, i když to často značně prodlužuje jejich trasu.

V posledních letech není výjimkou zimování v Evropě, např. ve Španělsku, Francii, Bulharsku či na Blízkém východě (převážně Izrael). Důvodem častějšího zimování mimo Afriku může být jak globální oteplování (mírnější zimy), tak vyšší potravní nabídka v místech zimování. Někteří čápi už dokonce neodlétají do zimovišť vůbec a úspěšně přezimují u nás (Cepák *et al.*, 2014).

3.4.5 Ochrana čápa bílého

V České republice je čáp bílý (*Ciconia ciconia*) chráněným druhem (Formánek, 1994). Negativní vliv na jeho výskyt má stále větší tlak ze strany člověka na využívání krajiny na hnízdištích, migračních trasách a zimovištích. Z mnoha důvodů je tak modelovým druhem pro studium migrace, chování ptáků, studium variability nebo genetické struktury populací.

3.5 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou sekvence repetitivní DNA (Tóth *et al.*, 2000), které se skládají z tandemově se opakujících jednotek. Různí autoři uvádějí různou velikost repetitivních jednotek: 2–8 bp (Goldstein *et al.*, 1997) nebo 1–5 bp (Schlötterer, 1998). Mnohdy se v jednom mikrosatelitu tato krátká sekvence za sebou mnohokrát opakuje a tvoří tak řetězec o délce až několik stovek bp. Nejčastějšími repetitivními jednotkami jsou

dinukleotid $(AC)_n$ a $(AT)_n$, kde n se vztahuje k celkovému počtu opakování, obvykle v rozsahu 10–100 (Queller, 1993). Avšak vyskytují se i repetic mono-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové (Tóth *et al.*, 2000). Mikrosatelity jsou rozptýlené po celém genomu. Vyskytují se u prokaryot (Zane *et al.*, 2002) i eukaryot (Tautz *et Renz*, 1984). Lze je nalézt jak v nekódujících, tak kódujících oblastech genomu (Tóth *et al.*, 2000), přičemž množství mikrosatelitních repetit v exonových úsecích je menší než v intronových (Tautz *et al.*, 1986).

Variabilita mikrosatelitů je způsobena mutacemi v počtu a délce opakujících se jednotek (Ellegren, 1992) a může být detekována s použitím techniky PCR. Jakmile je PCR reakce dokončena, je nutno vzniklé PCR produkty nějak analyzovat. K tomu slouží elektroforetická separace.

Mikrosatelity mají všestranné využití. Jsou široce využívány pro studium rostlin i živočichů, včetně člověka. Jsou populárně využívanými molekulárními markery pro populačně genetické, ekologické i fylogenetické studie (Primmer *et al.*, 2005). Tyto markery mohou být použity pro individuální identifikaci, vyloučení a potvrzení rodičovství i dalších forem příbuzenství (Parker *et al.*, 1998). Pro zachování stávajících populací je nezbytné znát genetickou strukturu, její dynamiku či jednotlivé příbuzenské vztahy mezi jedinci. Mikrosatelity se zdají být nejvhodnějšími dosud dostupnými genetickými markery pro tento účel (Zhang *et Hewitt*, 2003).

3.6 Ptačí mikrosatelity

Obecně lze říct, že genomy ptáků patří mezi genomy s malou velikostí a frekvence výskytu mikrosatelitních repetit tak je mnohem nižší než u jiných obratlovců (Primmer *et al.*, 1997). Během posledních dvaceti let se i tak u nich mikrosatelity staly jedny z nejčastěji používaných genetických markerů ve studiích populační biologie. Jedním z primárních faktorů omezujících jejich ještě širší aplikaci je však nedostatek univerzálních PCR primerů, které by úspěšně amplifikovaly homologní produkty napříč celou řadou druhů. Ačkoliv mikrosatelitní primery nelze obecně použít univerzálně, je možná určitá úroveň jejich amplifikace mezi úzce příbuznými druhy, tzv. *cross-species* PCR amplifikace (Moore *et al.*, 1991, Schlötterer *et al.*, 1991).

3.6.1 Mikrosatelity od druhů z řádu tučňáci

Podle Beattie *et al.*, 2019 jsou tučňáci (Sphenisciformes) nelétaví, mořští ptáci, kteří se vyskytují podél pobřeží Antarktidy, Austrálie, Nového Zélandu, Jihoafrické

republiky, Chile, Peru, Argentiny a ostrovů Galapágy. Většinu času tráví v oceánech, na souš přicházejí hlavně kvůli rozmnožování. Všichni disponují černo-bílým zbarvením, které jim slouží jako kamufláž. Když plavou, jejich bílé břicho splývá s jasnou vodní hladinou, naopak černý hřbet je nerozeznatelný od temné vody. Všichni tučňáci mají pevné, těžké kosti, které jim pomáhají ponořit se hluboko do vody. Jsou schopni zadržet dech až na několik minut. Průměrná délka života je 20 až 30 let. Existuje 18 druhů tučňáků, kteří se rozdělují do 6 rodů.

U 10 druhů z 5 rodů bylo v 11 pracích popsáno celkem 147 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Tabulka 1).

Tabulka 1: Klasifikace řádu tučňáci do jednotlivých rodů podle Bradford (2014) s popsányými mikrosatelitovými lokusy včetně citace.

rod	druh	počet mikrosatelitů	citace
<i>Aptenodytes</i>	tučňák císařský (<i>A. forsteri</i>)	-	
	tučňák patagonský (<i>A. patagonicus</i>)	-	
<i>Eudyptula</i>	tučňák nejmenší (<i>E. minor</i>)	8	Billing <i>et al.</i> (2007)
		20	Grosser <i>et Waters</i> (2015)
<i>Pygoscelis</i>	tučňák kroužkový (<i>P. adeliae</i>)	6	Roeder <i>et al.</i> (2001)
		14	
	tučňák oslí (<i>P. papua</i>)	11	Vianna <i>et al.</i> (2017)
	tučňák uzdičkový (<i>P. antarcticus</i>)	9	
		16	Kang <i>et al.</i> (2015)
<i>Megadyptes</i>	tučňák žlutooký (<i>M. antipodes</i>)	12	Boessenkool <i>et al.</i> (2008)
<i>Spheniscus</i>	tučňák Humboldtův (<i>S. humboldti</i>)	7	Schlosser <i>et al.</i> (2003)
		5	Schlosser <i>et al.</i> (2009)
		1	
	tučňák magellanský (<i>S. magellanicus</i>)	1	Aks <i>et al.</i> (2002)
	tučňák galapážský (<i>S. mendiculus</i>)	3	
		1	
	tučňák brýlový (<i>S. demersus</i>)	8	Labuschagne <i>et al.</i> (2013)

Tabulka 1: Pokračování.

rod	druh	počet mikrosatelitů	citace
<i>Eudyptes</i>	tučňák chocholátý (<i>E. sclateri</i>)	-	
	tučňák novozélandský (<i>E. pachyrhynchus</i>)	-	
	tučňák královský (<i>E. schlegeli</i>)	-	
<i>Eudyptes</i>	tučňák jižní skalní (<i>E. chrysocome</i>)	-	
	tučňák snárský (<i>E. robustus</i>)	-	
	tučňák žltorohý (<i>E. chrysolophus</i>)	25	Ahmed <i>et al.</i> (2009)
	tučňák severní (<i>E. moseleyi</i>)	-	

Tučňák nejmenší je jediným zástupcem rodu *Eudyptula*, u kterého bylo v pracích Billing *et al.* (2007) a Grosser *et Waters* (2015) popsáno 28 polymorfních lokusů.

Ve třech pracích (Roeder *et al.*, 2001, Kang *et al.*, 2015, Vianna *et al.*, 2017) bylo u 3 druhů, konkrétně u tučňáka kroužkového, tučňáka oslího a tučňáka uzdičkového, z rodu *Pygoscelis* nalezeno celkem 56 polymorfních lokusů.

12 mikrosatelitových lokusů bylo popsáno u jediného druhu (tučňák žlutooký) rodu *Megadyptes* (Boessenkool *et al.*, 2008).

Rod *Spheniscus* zahrnuje 4 druhy, tučňáka Humboldtova, tučňáka magellanského, tučňáka galapážského a tučňáka brýlového. U těchto zástupců bylo popsáno celkem 26 mikrosatelitových lokusů ve 4 pracích (Aks *et al.*, 2002, Schlosser *et al.*, 2003, Schlosser *et al.*, 2009, Labusechagne *et al.*, 2013).

Rod *Eudyptes* zahrnuje podle Bradford (2014) 7 druhů, nicméně celkem 25 mikrosatelitových lokusů bylo izolováno pouze od jediného druhu tučňáka žltorohého (Ahmed *et al.*, 2009).

3.6.2 Univerzální ptačí mikrosatelity

Pro mikrosatelity obecně platí, že je problém najít univerzální primery, které by fungovaly u většího spektra druhů (Primmer *et al.*, 2005). Dawson *et al.* (2010 a 2013)

proto vytvořili univerzální soubor mikrosatelitů, které by byly použitelné napříč třídou ptáků. V obou případech vycházeli z homologních sekvencí dvou druhů, zástupce řádu pěvců žebříčky pestré (*Taeniopygia guttata*) a zástupce řádu hrabavých kura bankivského (*Gallus gallus*). Na základě toho ve dvou pracích popsali charakteristiku 36 páru primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

3.7 Hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů

Mikrosatelitové lokusy se nejčastěji studují pomocí techniky PCR amplifikace. Obecně existují tři základní způsoby, jak získat nové mikrosatelitové lokusy v organismech, ve kterých ještě nebyly testovány.

3.7.1 Hledání mikrosatelitových lokusů *de novo*

U druhů, u kterých dosud nebyly nalezeny mikrosatelity, je nutné je izolovat *de novo*. Důvodem je skutečnost, že se mikrosatelity nacházejí obvykle v nekódujících oblastech, kde je míra nukleotidové substituce vyšší než v kódujících oblastech. V důsledku toho je strategie navrhování konzervovaných sekvencí univerzálních primerů pro mikrosatelity problematičtější. Tento způsob izolace mikrosatelitů může být náročný z hlediska úsilí i času, protože se tradičně skládá ze screeningu genomických knihoven vhodnými sondami (Rassmann *et al.*, 1991). Navzdory časové náročnosti se při něm získá jen malý podíl, přibližně 0,04–12 %, pozitivních klonů obsahujících mikrosatelitové lokusy. Taková izolační strategie může být účinná pouze u taxonů s vysokou frekvencí mikrosatelitů, jako u některých obratlovců, a kdykoli je potřeba pouze relativně nízký počet mikrosatelitů (Zane *et al.*, 2002). To může být případ rodičovství, kde vzhledem k dostatečné alelické rozmanitosti může být pro dosažení vysoké správnosti přiřazení dostatečný relativně nízký počet lokusů (Bernatchez *et al.*, 2000). Celková vypovídající hodnota mikrosatelitu však nezávisí jen na počtu nalezených lokusů, ale také na dalších faktorech, jako je například stupeň polymorfismu každého lokusu. Tyto strategie jsou tak méně užitečné, pokud se zabývají taxony s velmi nízkou frekvencí mikrosatelitů, jako jsou mimo jiné i ptáci.

3.7.2 *Cross-species* PCR amplifikace

Nejen z časových důvodů, se často přistupuje ke *cross-species* PCR amplifikaci. Tato metoda spočívá v hledání mikrosatelitových lokusů s využitím primerů, které již byly v minulosti odvozeny od jiných příbuzných druhů (Primmer *et al.*, 1996). V praxi to

tedy znamená použití genetických markerů, které již byly dříve zoptimalizovány u jiného, co nejvíce příbuzného druhu. Významnou výhodou této metody je to, že je časově i finančně méně náročná.

Mikrosatelitové primery nemohou být univerzálně použity u rozdílných druhů díky nakumulovaným mutacím v oblastech *flanking regions*, ale u blízce příbuzných druhů je *cross-species* PCR amplifikace relativně úspěšná (Primmer *et al.*, 2005). Bylo prokázáno, že úspěšnost amplifikace klesá s fylogenetickou vzdáleností zdrojového a testovaného druhu (Scribner *et Pearce*, 2000). Vztah mezi úspěchem *cross-species* PCR amplifikace a fylogenetickou vzdáleností mezi druhy byl nejrozsáhleji studován právě u ptáků (Hughes *et al.*, 1998, Dawson *et al.*, 2000, Galbulsera *et al.*, 2000). Tyto studie běžně pozorovaly negativní vztah mezi *cross-species* PCR amplifikací a evoluční vzdáleností od zdrojového druhu. Nicméně míra, s jakou je *cross-species* PCR amplifikace úspěšná, se mezi jednotlivými studii značně liší.

Velkým omezením dosud provedených studií, je to, že i ty nejrozsáhlejší studie byly zaměřeny buď na testování úspěchu lokusů z malého počtu zdrojových druhů na velkém počtu testovaných druhů (např. Primmer *et al.*, 1996, Dawson *et al.*, 2000, Galbulsera *et al.*, 2000) nebo naopak (Dallimer, 1999). Tuto skutečnost může vysvětlovat nedostatek shod v již popsáných studiích, proč dosud nebylo možné identifikovat obecné rysy nebo analytické metody, které by poskytovaly úspěch *cross-species* PCR amplifikace. Identifikace takových obecných rysů, pokud existují, by neposkytla pouze důležité informace o vývoji oblastí genomu, které obsahují mikrosatelity, ale mohla by mít také praktický význam pro zvýšení účinnosti polymorfni *cross-species* mikrosatelitní identifikace (Primmer *et al.*, 2005).

Zkoumání *cross-species* PCR amplifikace u ptáků bylo podpořeno dostupností řady fylogenetických stromů ptáků. Je však nepravděpodobné, že by odhad míry úspěchu *cross-species* PCR amplifikace, očekávaný na konkrétních taxonomických úrovních, odhalil jakékoliv obecné trendy, protože většina fylogenetických stromů přesně neodráží genetickou divergenci (Avise *et Johns*, 1999).

4 Materiály a metody

4.1 Biologický materiál

Pro genetické analýzy praktické části této bakalářské práce byly použity vzorky krve od 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Každý vzorek pocházel od mládřat z jiného hnízda. Ze vzorků krve byla vedoucím bakalářské práce izolována genomická DNA pomocí fenol - chloroformové metody. DNA po rozpuštění dosahovala koncentrace 5–20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza ($5 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), M1241 (Promega)
- bromfenolová modř (Serva)
- deionizovaná voda
- dNTPs ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 400 μl od každého), U1240 (Promega)
- dusičnan stříbrný (Sigma)
- ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachner)
- formaldehyl (Lachner)
- formamid (Lachner)
- hydroxid sodný (Lachner)
- chlorid sodný (Lachema)
- kyselina boritá (Lachner)
- kyselina dusičná 65% roztok (Lachner)
- kyselina octová (Lachner)
- močovina (Lachner)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED) (AppliChem)
- N, N' - methylenbisakrylamid (AppliChem)
- peroxidisíran amonný (Lachner)
- Rain off - tekuté stěrače (Sheron)
- thiosíran sodný (Lachema)
- trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- uhličitan sodný (Lachner)

- xylenová modř (xylen kyanol FF) (AppliChem)

Použité roztoky

- **3-methakryloxypropyltrimethoxysilan - pracovní roztok**

1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu, 3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu.

- **Akrylamid - 6% zásobní roztok**

420 g močoviny, 484 ml deionizované vody, 50 ml 10x TBE, 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid - N, N' - methylenbisakrylamid (19:1).

- **Dusičnan stříbrný - 0,1% roztok**

800 ml deionizované vody, 0,8 g dusičnanu stříbrného, uchovávat v chladničce (4 °C). Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu.

- **Fix/stop**

80 ml kyseliny octové, doplnit deionizovanou vodou na 800 ml, po prvním použití slít nazpět do Erlenmayerovy baňky.

- **Hydroxid sodný - roztok 1 mol \cdot l⁻¹**

40 g hydroxidu sodného rozpustit v 800 ml vody, doplnit objem na 1 l.

- **MgCl₂ pro Taq DNA polymerázu - 25 mmol \cdot l⁻¹**

90 ml deionizované vody, 0,508 g MgCl₂·6 H₂O, po rozpuštění doplnit na 100 ml.

- **Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu**

0,125 g bromfenolové modři, 0,125 g xylenové modři, 25 ml deionizované vody, 100 ml formamidu.

- **Peroxodisíran amonný - 10% roztok**

1 g peroxodisíranu amonného, rozpustit v 10 ml deionizované vody, uchovávat v chladničce.

- **Polyakrylamidový gel - 6% roztok**

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu, 40 μ l N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu, 400 μ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného.

- **Reakční pufr pro Taq DNA polymerázu – 10x**

80 ml deionizované vody, 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu, 3,73 g KCl, 1 ml Triton X-100, 80 ml deionizované vody, pH upravit pomocí HCl na hodnotu 9,0. Rozpustit a doplnit na 100 ml.

- **Vývojka**

800 ml deionizované vody, 24 g uhličitanu sodného, uchovávat v ledničce (4 °C). Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného.

- **Zásobní roztok TBE - 10x**

108 g trishydroxymethylaminomethanu, 55 g kyseliny borité rozpustit v 800 ml deionizované vody, 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol·l⁻¹ (pH 8,0) , doplnit objem na 1 l.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- elektroforetický zdroj EV 232 (Consort)
- hybridizační pec HB-2D (Techne)
- chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- magnetická míchačka MRHei-Combi (Heidolph)
- mikropipety Finnpiette 0,3 µl–1 ml (Thermo Labsystems)
- mikropipety Finnpiette 0,510 µl (osmikanálová) (Thermo Labsystems)
- mikropipety Nichipet EX 0,5 µl–1 ml
- minicentrifuga CLE CSQSP (Clevaer Scientific)
- minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- negatoskop NEGA1 (Maneko)
- sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- sušárna CAT 8050 (Contherm)
- termocykler GenePro (BIOER Technology)
- termocykler XP cycler (BIOER Technology)
- termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- třepačka Orbit 1900 (Labnet International)
- vortex mixer (Labnet International)
- vortex MS2 (Ika)
- výrobce deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- výrobce šupinkového ledu IceMaker (Brema)

4.4 PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů

Genomická DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého byla postupně testována se 173 páry primerů amplifikujícími příslušné mikrosatelitové lokusy. 113 párů primerů bylo primárně navrženo pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů u 9 druhů z řádu tučňáci (Sphenisciformes) (Tabulka 2). 60 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů (Tabulka 3).

Tabulka 2: Seznam testovaných mikrosatelitových lokusů pocházejících z řádu tučňáci.

mikrosatelitový lokus	zdrojový druh	literární zdroj
Ech003, Ech005, Ech007, Ech008, Ech009, Ech010, Ech011, Ech012, Ech014, Ech020, Ech024, Ech029, Ech030, Ech036, Ech039, Ech050, Ech051, Ech060, Ech063, Ech065, Ech071, Ech081, Ech091, Ech113, Ech130	tučňák žltorohý <i>Eudyptes chrysolophus</i>	Ahmed <i>et al.</i> (2009)
Emm1, Emm2, Emm3, Emm4, Emm5, Emm6, Emm7, Emm8		Biling <i>et al.</i> (2007)
Em1, Em2, Em4, Em5, Em6.2, Em8, Em9, Em12.2, Em13, Em14, Em15, Em21, Em22, Em23, Em24, Em26, Em27, Em28, Em29.2, Em30	tučňák nejmenší <i>Eudyptula minor</i>	Grosser <i>et Waters</i> (2015)
Man03, Man08, Man13, Man21, Man22, Man27, Man39, Man47, Man50, Man51, Man54, Man55	tučňák žlutooký <i>Megadyptes antipodes</i>	Boessenkool <i>et al.</i> (2008)
Sh1Ca9, Sh1Ca12, Sh1Ca16, Sh1Ca17, Sh2Ca12, Sh2Ca21, Sh2Ca22		Schlosser <i>et al.</i> (2003)
Sh2Ca31, Sh2Ca40, Sh2Ca49, Sh2Ca55, Sh2Ca58	tučňák Humboldtův <i>Spheniscus humboldti</i>	Schlosser <i>et al.</i> (2009)
H2-6		
M1-11	tučňák magellanský <i>S. magellanicus</i>	
G2-2, G3-6, G3-11	tučňák galapážský <i>S. mendiculus</i>	Akst <i>et al.</i> (2002)
B2-2		
PNN01, PNN03, PNN05, PNN06, PNN07, PNN08, PNN09, PNN12	tučňák brýlový <i>S. demersus</i>	Labuschagne <i>et al.</i> (2013)

Tabulka 2: Pokračování.

mikrosatelitový lokus	zdrojový druh	literární zdroj
Pygantarc02, Pygantarc03, Pygantarc06, Pygantarc07, Pygantarc11, Pygantarc15, Pygantarc16, Pygantarc18, Pygantarc19, Pygantarc22, Pygantarc24, Pygantarc25, Pygantarc26, Pygantarc27, Pygantarc28, Pygantarc29	tučňák uzdičkový <i>Pygocelis antarctica</i>	Kang <i>et al.</i> (2015)
AM3, AM12, AM13, TP500, RM3, RM6	tučňák kroužkový <i>P. adeliae</i>	Roeder <i>et al.</i> (2001)

Tabulka 3: Seznam testovaných EST ptačích mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

mikrosatelitový lokus	zdroj	literární zdroj
TG01-000, TG01-040, TG01-077, TG01-086, TG01-092, TG01-114, TG01-124, TG01-147, TG01-148, TG02-078, TG02-088, TG02-120, TG03-002, TG03-031, TG03-034, TG03-035, TG03-098, TG04-004, TG04-012, TG04-012A, TG04-041, TG04-061, TG05-030, TG05-046, TG05-053, TG06-009, TG07-022, TG08-024(1), TG08-024(2), TG09-014, TG11-011, TG12-015, TG13-009, TG13-016, TG13-017, TG22-001	EST ptačí mikrosatelity	Dawson <i>et al.</i> (2010)
CAM-01, CAM-02, CAM-03, CAM-04, CAM-05, CAM-06, CAM-07, CAM-08, CAM-09, CAM-10, CAM-11, CAM-12, CAM-13, CAM-14, CAM-15, CAM-16, CAM-17, CAM-18, CAM-19, CAM-20, CAM-21, CAM-22, CAM-23, CAM-24	konzervované ptačí mikrosatelity	Dawson <i>et al.</i> (2013)

Postup PCR amplifikace

1. Nechat rozmraznout jednotlivé složky PCR mixu (Tabulka 4), zvortexovat a zcentrifugovat.

Tabulka 4: Složení PCR mixu pro 6 vzorků.

složky PCR mixu	objem [μ l]
deionizovaná voda	44,4
reakční pufr 10x	6,7
roztok $MgCl_2$ ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	4,0
roztok dNTPs ($20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,7
primer F ($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	3,3
primer R ($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	3,3
<i>aTaq</i> polymeráza ($5 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	1,0

- Na jednu reakci připravit šest 0,2ml PCR mikrozkušavek a jednu 1,5ml mikrozkušavku.
- Do 0,2ml PCR mikrozkušavek napipetovat multikanálovou pipetou po 1 μ l genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého.
- Do 1,5ml mikrozkušavky napipetovat všechny složky PCR mixu podle Tabulky 4. Směs zvortexovat a zcentrifugovat.
- Ke genomické DNA připipetovat po 9 μ l PCR mixu.
- Dobře uzavřít 0,2ml PCR mikrozkušavky, vložit do termocykleru a nastavit základní teplotní program podle Tabulky 5. Pro první testování byla použita základní teplota *annealingu* T_A 50 °C u všech vzorků. Pro následnou optimalizaci PCR podmínek tuto teplotu upravit snížením nebo zvýšením. Postup změny teploty *annealingu* je vysvětlen v kapitole Výsledky.

Tabulka 5: Základní teplotní a časový program PCR reakce.

1	94 °C	5 min	1x
2	94 °C	30 s	35x
	50 °C	30 s	
	72 °C	30 s	
3	72 °C	7 min	1x

4.5 Elektroforetická separace

Následující postup byl optimalizován pro elektroforetickou separaci probíhající za denaturujících podmínek. Separace probíhá za použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra s rozměry skel (330 x 390 mm) a (330 x 420 mm), s tloušťkou gelu 0,4 mm.

Příprava 6% polyakrylamidového gelu

1. Velké i malé sklo umístit na polystyrenové podložky do digestoře.
2. Velké sklo důkladně omýt deionizovanou vodou, osušit do sucha papírovými utěrkami a dvakrát omýt 96% ethanolem, znova osušit do sucha. Aby nedošlo k přilepení gelu na obě skla, nutno velké sklo ošetřit přípravkem odpuzujícím vodu, běžně používaným na skla automobilů, Rain-off - tekuté stěrače. Po 5 minutách sklo znova dvakrát omýt deionizovanou vodou a utřít do sucha papírovými utěrkami.
3. Malé sklo opláchnout dvakrát deionizovanou vodou, dvakrát 96% ethanolem a osušit do sucha, stejně jako velké sklo. Aby došlo k dokonalému přilepení gelu, nutno sklo ošetřit 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanem (molekulární lepidlo). Po 5 minutách čtyřikrát sklo omýt 96% ethanolem a utřít papírovými utěrkami.
4. Na velké sklo připravit dva 0,4 mm silné spacery. Na spacery položit malé sklo. Spacery upravit tak, aby byly umístěny těsně podél delších stran skel a jejich gumové části těsně přiléhaly ke kratší straně malého skla. Takto připravená skla zpevnit dvěma klipsy po každé straně.
5. V kádince připravit 6% polyakrylamidový gel. Gel pomalu nalévat, v místě gumových částí spacerů, mezi obě skla tak, aby nedocházelo k vytvoření bublin v gelu.
6. Po vyplnění veškerého prostoru mezi skly gelem, v místě nalévání umístit hřebínek rovnou stranou do gelu. Skla, s hřebínkem mezi nimi, zpevnit čtyřmi klipsy. Polymerizace gelu trvá minimálně 60 minut.

Příprava vzorků a elektroforetické komůrky

1. Po zpolymerizování gelu odstranit všechny klipsy a skla důkladně omýt kartáčkem od zbytků polyakrylamidu, osušit papírovými utěrkami do sucha.
2. Skla vložit hřebínkem nahoru a menším sklem směrem dovnitř do elektroforetické komůrky. Zde skla pevně upevnit šrouby. Anodový i katodový prostor zalít 0,5x TBE pufrem.
3. Z prostorů mezi skly vyjmout hřebínek a ze vzniklého prostoru odstranit zbytky gelu a vzduchových bublin proudem pufru z injekční stříkačky.
4. Uzavřít anodový i katodový prostor a spustit zdroj elektrického proudu na výkon 90 W. Hodnotu elektrického napětí nastavit na 3000 V a hodnotu elektrického

proudu nastavit na 150 mA. Za těchto podmínek nechat gel nahřívat po dobu 30 minut.

5. Během doby nahřívání gelu připravit vzorky. Všechny mikrozkušavky s PCR produkty otevřít a odstříhnout víčka. Do každé mikrozkušavky napipetovat osmikanálovou pipetou po 5 μ l nanášecího pufru.
6. 5 minut před ukončením nahřívání gelu připravené vzorky vložit do termocyklieru. Po dobu 3 minut je nechat denaturovat při 94 °C. Po uběhnutí denaturace mikrozkušavky okamžitě vložit na připravenou ledovou tříšť.

Elektroforetická separace

1. Po uplynutí času nahřívání odpojit přívod stejnosměrného elektrického proudu. Otevřít katodový prostor a prostor mezi skly opět vyčistit pomocí injekční stříkačky s 0,5x TBE puftrem, odstranit tím zbytky polyakrylamidu a močoviny.
2. Po důkladném pročištění prostoru mezi skly do něj zasunout zoubky hřebínku přibližně 1 mm hluboko do gelu.
3. Osmikanálovou pipetou nanést do gelu po 2 μ l od každého vzorku.
4. Prostor katody znova uzavřít a připojit ke zdroji stejnosměrného proudu. Hodnotu elektrického výkonu snížit na 70 W, hodnoty elektrického napětí a proudu nechat na 3000 V a 150 mA.
5. Za těchto podmínek nechat vzorky separovat po dobu 1,5–3 hodiny.
6. V průběhu separace přichystat roztok fix/stop, roztok 1% kyseliny dusičné a nechat je v digestoři. Nachystat také vývojku, prozatím bez formaldehydu a thiosíranu sodného a uložit do chladničky.
7. Po uplynutí času separace vzorků, vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu a odpojit elektrody z elektroforetické komůrky.
8. Povolit boční šroub a nechat odtéct pufr z katodového prostoru. Povolit i zbylé přední šrouby, vyjmout skla s gelem z komůrky a položit menším sklem směrem vzhůru na vodorovnou vyvýšenou plochu.
9. Vytáhnout spacers a hřebínek, nožem odpáčit skla od sebe

Vizualizace elektroforetogramu

1. Malé sklo s gelem přenést do fotomisky na třepačku v digestoři a zalít roztokem fix/stop a nechat působit 20 minut. Po uplynutí doby působení roztok slít zpět do Erlenmayerovy baňky a uchovat pro pozdější použití. Sklo v misce třikrát opláchnout v deionizované vodě.
2. Stejnou fotomisku vrátit zpět na třepačku a gel zalít roztokem 1% kyseliny dusičné a nechat působit 4 minut. Po uplynutí doby působení roztok slít do odpadu a sklo v misce čtyřikrát propláchnout v deionizované vodě.
3. Sklo vyjmout z fotomisky a vložit na třepačku do nové fotomisky určené pro roztok dusičnanu stříbrného. Gel zalít roztokem 0,1% dusičnanu stříbrného, ke kterému před použitím připipetovat 1,2 ml formaldehydu a nechat působit 30 minut.
4. Těsně před koncem působení dusičnanu stříbrného, vytáhnout roztok vývojky z chladničky a připipetovat 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l 1% roztoku thiosíranu sodného. Připravit misku s deionizovanou vodou.
5. Roztok dusičnanu stříbrného slít zpět do Erlenmayerovy baňky a uchovat pro pozdější použití. Sklo s gelem velmi krátce, asi na 10 s, vložit do připravené misky s deionizovanou vodou.
6. Sklo s gelem přenést na třepačku do fotomisky pro vyvolání a zalít roztokem připravené vývojky. Sledovat vyvíjení stříbrem obarvených hnědošedých proužků PCR produktů a jakmile byly tyto proužky dostatečně zřetelné, pro zastavení reakce přilít roztok fix/stop a nechat působit 2 minuty.
7. Vše slít do odpadu. Sklo s gelem přemístit na 1 minutu do misky s deionizovanou vodou a potom nechat vysušit v sušárně na 90 °C po dobu 30 minut.
8. Usušený gel přenést na negatoskop a vyhodnotit výsledek PCR amplifikace. Poté sklo naskenovat.
9. Sklo s gelem namočit na několik hodin do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol·l⁻¹ a tím ho odlepit od skla. Poté sklo umýt a připravit ho tak k dalšímu použití.

5 Výsledky

Ve své bakalářské práci jsem pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace hledala polymorfní mikrosatelitní lokusy u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). U 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého jsem nejprve testovala celkem 113 párů primerů, které pocházely od zástupců řádu tučňáci. Následně jsem testovala 24 párů primerů navržených pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů a 36 párů primerů navržených pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů.

Nejdříve jsem se všemi 173 mikrosatelity provedla *cross-species* PCR amplifikaci při počáteční teplotě *annealingu* 50 °C. Následně byly všechny vzniklé PCR produkty separovány v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek po dobu 90 minut. Většina mikrosatelitů při počáteční teplotě poskytovala PCR produkt, ale často problematicky hodnotitelný. Bylo tak nutné podmínky, resp. složení PCR mixu, teplotu *annealingu* a dobu elektroforetické separace, optimalizovat pro každý mikrosatelitový lokus zvlášť, aby bylo možné mikrosatelit vygenotypovat.

Ve dvou případech se při počáteční teplotě 50 °C v polyakrylamidovém gelu neobjevil žádný PCR produkt, teplotu *annealingu* jsem pro další aplikaci proto snížila na 48 °C. Ve všech zbylých případech byly PCR produkty velmi výrazné a nebylo tak možné rozlišit počty alel, teplotu *annealingu* jsem tedy postupně zvyšovala. Nejvyšší teplotu jsem použila 67 °C.

Pro ideální pozici a rozlišení alel bylo v některých případech nutné prodloužit délku elektroforetické separace. Pro tři mikrosatelity jsem tak učinila na 120 minut, pro další dva na 150 minut a dvakrát až na 180 minut. Ve dvou případech jsem musela také upravit koncentrace hořčnatých iontů, neboť nebyly PCR produkty jednoznačně hodnotitelné. Pro oba mikrosatelity (TG03-098 a CAM10) byla použita teplota *annealingu* 48 °C a koncentraci hořčnatých iontů jsem snížila z původní koncentrace na $\frac{3}{4}$, tedy na hodnotu 1,2 nmol·l⁻¹. Toho jsem docílila snížením objemu pipetovaného roztoku MgCl₂, o stejnou hodnotu jsem navýšila objem deionizované vody, aby byl zachován celkový objem v příslušném PCR mixu.

Každý pár mikrosatelitových primerů mi poskytl PCR produkty. Amplifikací 173 párů primerů jsem našla polymorfní produkt v 19 případech. Bližší charakteristiky jednotlivých mikrosatelitů jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Charakteristika 19 párů primerů a jimi amplifikovaných 19 polymorfních lokusů testovaných na 6 nepříbuzných jedincích čápa bílého. V tabulce je uvedeno společně s názvem mikrosatelitového lokusu jeho identifikační číslo v databázi GenBank, zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel N, teplota *annealingu* T_A [°C] a délka elektroforetické separace t_s [min].

název lokusu (GenBank Acc. No.)	zdrojový druh	sekvence primerů (5'→3')	jednotka repetice	N	T_A [°C]	t_s [min]
Ech020 (FM878351)	tučňák žlutorohý	F: GCTCCCTTGCAAACGAAACC R: AAACGTGGATAGACAGATGCAGAGAG	CTTT	2	57	90
Ech030 (FM878361)		F: TGACGCCCGCAGGGACTTC R: GCTCAGCTCTTGCTCACAGTTTCAG	CTAT	2	62	90
Sh2Ca12 (AF540010)	tučňák Humboldtův	F: TCAGTGTACGAGCCAGAAGG R: CTAGGATCCCGGCTTTTGTC	T/CA/A	2	65	90
Pygantarc16 (KP316217)	tučňák uzdičkový	F: TTTGAGATGCTGGGAAAAGA R: CAGACTGCATGGAGAAGCAA	AC	2	57	90
Em8 (KM272226)	tučňák nejmenší	F: GGTGCTGGGAGATGGCTTC R: ACGAAATGGTTTGGCTGGTG	AGAT	3	56	90
Em14 (KM272230)		F: CAGGAGTGAACCCAAAGCTG R: AGGTACCGAGGGAAGCAAAG	CAA	2	66	90
Emm8 (DQ83772934)		F: TGCACACTAGCAGATACGG R: GACAAATTGTGCTTGTGTCAGC	CA/CT	2	62	90
Man27 (EU267114)	tučňák žlutooký	F: GATCCTGAGAAGAGAGACAG R: GGCTGTTCATTTTGTGTCAC	GA/CA/GT/GCA	2	57	90
RM6 (AF289547)	tučňák kroužkový	F: CAGGAGGCTTTGAGACAA R: CTGTTTACATCCGATGCA	CA	2	55	90

Tabulka 6: Pokračování.

název lokusu (GenBank Acc. No.)	zdrojový druh	sekvence primerů (5'→3')	jednotka repetice	N	T_A [°C]	t_s [min]
TG01-124 (CK306631)	EST mikrosatelity	F: AGTACTACTTGCCTGCAGAGTTTAT R: TGTGTATGGCAGCATTACAA	AT	2	50	180
TG03-002 (DV575298)		F: TCTTGCCTTTTTGGTATGAGTATAG R: TACAAAGCACTGTGGAGCAG	TG/AT/AC/GC	2	61	90
TG03-098 (DV573670)		F: TTTGCCTTAATTCTTACCTCATTG R: TTGCAACCTCTGTGGAAGC	AG/AA	2	48	180
TG08-24(1) (CK314428)		F: CCCACAAATCCTGAATTTTCATATC R: ACTGGCTTATAAAGTCCCATGGTTG	AT/AG/AA	2	65	120
TG13-017 (CK313422)		F: GCTTTGCATCTTGCCTTAAA R: GGTAAC TACAACATTCCAAC TCT	AT	2	55	120
CAM-05 (nevedeno)	konzervované ptačí mikrosatelity	F: TTACACAGACTGCAAACCGC R: CTGTTKCTCTAGTAATGAGATCCTG	CA	2	60	150
CAM-10 (nevedeno)		F: TATCCGAGAATGGGCATC R: GCTCTCATTGTCATGCTG	GT	2	48	90
CAM-11 (nevedeno)		F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGRGAGCGGATG	GT	2	56	90
CAM-15 (nevedeno)		F: GACGACTCCTTTATTTCCC R: TTCTGACTTCCCAGGTAACAC	GA	2	50	150
CAM-24 (nevedeno)		F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	CA	2	60	90

U všech polymorfních mikrosatelitů jsem provedla genotypizaci na 6 nepříbuzných jedincích čápa bílého (Tabulka 7).

Tabulka 7: Genotypy 19 polymorfních mikrosatelitů amplifikovaných na DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého.

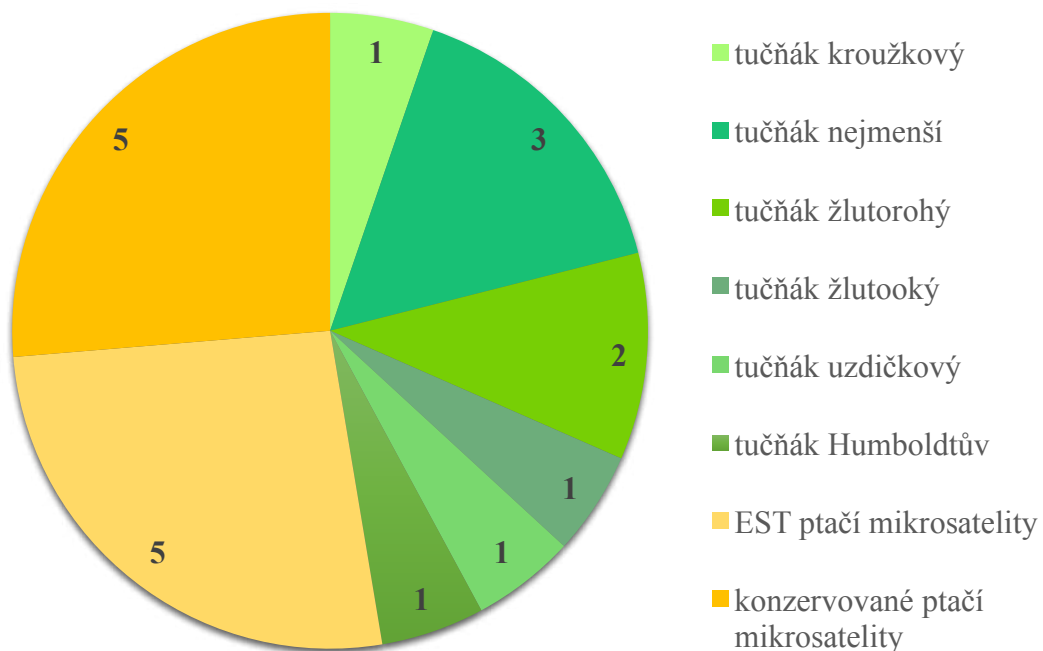
lokus	zdrojový druh	genotyp 6 jedinců
Ech020	tučňák <i>Eudyptes</i>	$1/2$ $1/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
Ech030	žlutorohý <i>chrysolophus</i>	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$
Sh2Ca12	tučňák Humboldtův <i>Spheniscus</i> <i>humboldti</i>	$2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$
Pyga 16	tučňák uzdičkový <i>Pygocelis</i> <i>adeliae</i>	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/1$ $1/2$ $1/2$
Em8	tučňák nejmenší <i>Eudyptes minor</i>	$1/2$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $3/3$ $3/3$
Em14		$1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$
Emm8		$2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$
Man27	tučňák žlutooký <i>Megadyptes</i> <i>antipodes</i>	$1/2$ $1/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
RM6	tučňák kroužkový <i>Pygocelis</i> <i>antarctica</i>	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/1$ $1/2$ $1/2$
TG01-124	EST ptačí mikrosatelity	$1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/2$ $1/2$ $1/2$
TG03-002		$2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$
TG03-098		$1/2$ $1/1$ $2/2$ $1/2$ $1/1$ $1/1$
TG08-24(1)		$1/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$ $1/2$
TG13-017		$1/2$ $1/1$ $2/2$ $1/2$ $1/1$ $1/1$
CAM-05	konzervované ptačí mikrosatelity	$1/2$ $2/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/2$
CAM-10		$2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$
CAM-11		$1/2$ $1/2$ $1/2$ $1/2$ $1/1$ $1/1$
CAM-15		$1/1$ $1/1$ $2/2$ $2/2$ $1/1$ $2/2$
CAM-24		$2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$

Cílem *cross-species* PCR amplifikace 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého bylo nalézt polymorfní mikrosatelitové lokusy. Z celkového počtu 173 testovaných mikrosatelitů byl zjištěn polymorfismus u 19 z nich, což představuje úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitových lokusů 10,98 %. Až na jednu výjimku jsem u všech

mikrosatelitů detekovala výskyt dvou alel. Pouze u mikrosatelitového lokusu Em8 se vyskytovaly 3 alely.

Z počtu 113 testovaných mikrosatelitů z řádu tučňáci bylo 9 polymorfních, což představuje 7,89% úspěšnost. Mikrosatelity byly izolovány od 9 druhů, polymorfní lokusy však byly nalezeny pouze u 6 z nich. 3 polymorfních lokusy pocházely od tučňáka nejmenšího, jeden pár byl navržen pro t. kroužkového, dva páry pro t. žltorohého, jeden pár pro t. žlutookého a jeden pár pro t. Humboldtova. Ze 60 testovaných univerzálních ptačích mikrosatelitů polymorfismus vykazovalo 10 z nich, což představuje 16,66% úspěšnost. 5 párů primerů bylo navrženo pro EST ptačí mikrosatelity a 5 pro konzervované ptačí mikrosatelity. Znázornění polymorfních mikrosatelitů u čápa bílého podle druhů, ze kterých byly izolovány, je uvedeno na Obrázku 5.

Obrázek 5: Graf rozdělení 19 polymorfních mikrosatelitových lokusů podle příslušných zdrojových druhů, ze kterých byly izolovány. Žlutě jsou značeny univerzální ptačí mikrosatelity a zeleně druhy z řádu tučňáci.



Na následujících fotografiích jsou znázorněny výsledky elektroforetické separace vybraných PCR produktů po provedení *cross-species* PCR amplifikace lokusu Em14 (Obrázek 6), Em8 (Obrázek 7), TG01-124 (Obrázek 8) a TG13-017 (Obrázek 9).

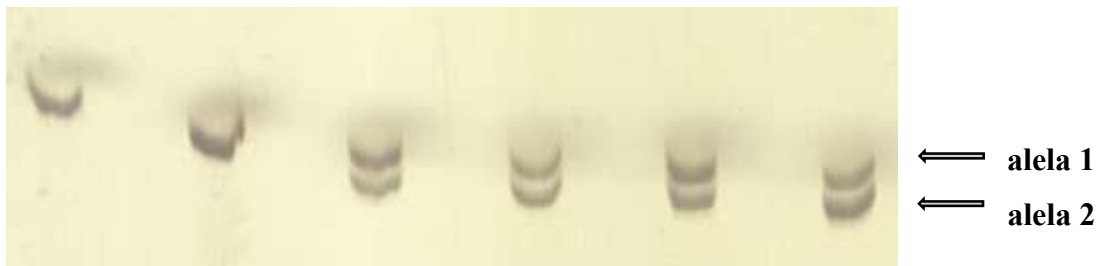
Obrázek 6: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitového lokusu Em14. U 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého byly detekovány 2 alely, které jsou označeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 66 °C a délka elektroforetické separace 90 minut.



Obrázek 7: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitového lokusu Em8. U 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého byly detekovány 3 alely, které jsou označeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 56 °C a délka elektroforetické separace 90 minut.



Obrázek 8: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitového lokusu TG01-124. U 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého byly detekovány 2 alely, které jsou označeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 50 °C a délka elektroforetické separace 180 minut.



Obrázek 9: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitového lokusu TG13-017. U 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého byly detekovány 2 alely, které jsou označeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 55 °C a délka elektroforetické separace 120 minut.



6 Diskuze

V praktické části této bakalářské práce jsem se na základě metody *cross-species* PCR amplifikace zabývala hledáním polymorfních lokusů. Na šesti nepříbuzných jedincích čápa bílého jsem postupně testovala polymorfismus 173 mikrosatelitových lokusů. Celkem vykazovalo polymorfismus 19 z nich, z toho 9 pocházelo od 6 druhů tučňáků, 5 EST ptačích mikrosatelitů a 5 univerzálních ptačích mikrosatelitů.

113 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci mikrosatelitů pocházejících od 9 druhů tučňáků. Konkrétně 28 bylo navrženo pro tučňáka nejmenšího, 25 pro t. žltorohého, 16 pro t. uzdičkového, 13 pro t. Humboldtova, 12 pro t. žlutookého, 9 pro t. brýlového, 6 pro t. kroužkového, 3 pro t. galapážského a 1 pro t. magellanského. 36 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Z 25 mikrosatelitů izolovaných od tučňáka žltorohého jsem testováním na DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého našla 2 polymorfní lokusy. Stejně lokusy testoval Ahmed *et al.* (2009) na 17–28 jedincích tučňáka žltorohého při jednotné teplotě *annealingu* T_A 60 °C. U obou mikrosatelitů autoři našli 11 alel. Já jsem mikrosatelit Ech020 amplifikovala při 57 °C a detekovala jsem 2 alely. Pro mikrosatelit Ech030 jsem detekovala 2 alely při T_A 62 °C.

U tučňáka Humboldtova bylo ve třech pracích popsáno 13 mikrosatelitů. Testováním těchto mikrosatelitů na DNA 6 jedinců čápa bílého jsem našla jediný polymorfní mikrosatelitový lokus. Lokus Sh2Ca12 testovali Schlosser *et al.* (2003) a při T_A 60 °C detekovali 6 alel. Já jsem detekovala 2 alely při T_A 65 °C.

Kang *et al.* (2015) charakterizovali 16 polymorfních mikrosatelitových lokusů u 23 jedinců tučňáka uzdičkového, při snižující se T_A v průběhu 42 cyklů. Prvních 7 cyklů disponovalo nejvyšší T_A 65 °C, dalších 7 cyklů T_A 61 °C, 7 cyklů T_A 58 °C a posledních 21 cyklů T_A 55 °C. Po otestování všech mikrosatelitů na DNA 6 jedinců čápa bílého jsem detekovala jediný polymorfní mikrosatelitový lokus Pygantarc16 se 2 alelami, stejně tak, jako uvádějí autoři.

Testováním 28 párů primerů pocházejících od tučňáka nejmenšího jsem našla 3 polymorfní mikrosatelitové lokusy. Všech 20 lokusů, které popsali Grosser *et Waters* (2015), amplifikovali při T_A 60 °C. Z těchto 20 lokusů jsem polymorfní produkt detekovala u dvou z nich. U lokusu Em 8 a Em14 našli shodně 10 alel. Já jsem testováním

6 čápů amplifikovala lokus Em8 při T_A 56 °C a detekovala jsem 3 alely. Lokus Em14 jsem amplifikovala při T_A 66 °C a detekovala jsem 2 alely. Lokus Emm8 Billing *et al.* (2007) testovali při T_A 56 °C na 5 jedincích z populace na Troubridgeově ostrově a našli 4 alely a na 26 jedincích z populace na Filipově ostrově a našli 3 alely. Já jsem testovala 6 čápů a našla jsem 2 alely, pro které jsem použila T_A 62 °C.

Od tučňáka žltorohého jsem testovala celkem 12 mikrosatelitů, z nichž polymorfni byl pouze Man27. Boessenkool *et al.* (2017) testovali 43 jedinců a pro tento mikrosatelit našli 2 alely při T_A 48 °C. Já jsem mikrosatelit otestovala na 6 čápech při T_A 57 °C a detekovala jsem také 2 alely.

U 6 testovaných mikrosatelitů izolovaných od tučňáka kroužkového jsem jako polymorfni určila pouze lokus RM6. Roeder *et al.* (2001) amplifikovali při T_A 57 °C a našli u něj 6 alel. Já jsem amplifikací tohoto lokusu u čápa bílého detekovala při 55 °C 2 alely.

Žádný polymorfni produkt jsem nenašla testováním 9 mikrosatelitů od tučňáka brýlového, 3 mikrosatelitů od tučňáka galapážského a 1 mikrosatelitu od tučňáka magellanského.

Dále jsem testovala 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů, kam patřily EST mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity. Pomocí těchto 60 párů primerů se mi podařilo amplifikovat 10 polymorfni mikrosatelitních lokusů na DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého.

Dawson *et al.* (2010) charakterizovali 35 mikrosatelitů, pro které bylo navrženo 36 párů primerů. Autoři amplifikovali všechny popsané EST mikrosatelity u 4 jedinců žebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*), u 1 jedince kura domácího (*Gallus gallus*) a u 4 jedinců divoké formy kura domácího při T_A 56 °C. Lokus TG01-124 dle autorů obsahoval 3 alely u žebřičky pestré, 1 alelu u kura domácího a 2 alely u jeho divoké formy. Já jsem u tohoto lokusu našla 2 alely, které amplifikovali při T_A 50 °C. Pro lokus TG03-002 autoři našli 2 alely u žebřičky pestré a 1 alelu u kura domácího, u jeho divoké formy našli alely 2. Optimální T_A jsem stanovila na 61 °C a u 6 čápů jsem našla 2 alely. Testováním 4 jedinců žebřičky pestré byly nalezeny 3 alely, 1 jedince kura domácího a 4 jedinců jeho divoké formy bylo nalezeno po 1 alele pro lokus TG03-098. Já jsem testováním čápů za snížené $3/4$ koncentrace $MgCl_2$ určila 2 alely při teplotě 48 °C. Dále jsem měla polymorfni lokus TG08-24(1), u kterého jsem detekovala 2 alely, T_A byla

65 °C. Autoři tento lokus testovali u jedinců žebřičky pestré a našli 6 alel a u jedinců kura domácího, i u jeho divoké formy, našli shodně po 1 alele. U lokusu TG13-017 bylo detekováno 5 alel u žebřičky pestré, 1 alela u kura domácího a 2 alely u jeho divoké formy. Testováním 6 čápů jsem našla 2 alely při T_A 55 °C. Autoři také testovali všech 35 EST mikrosatelitů pomocí *cross-species* PCR amplifikace pokaždé alespoň u 4 jedinců od každého ze 17 druhů pěvců a 5 ostatních druhů ptáků. U těchto druhů bylo polymorfních 33 mikrosatelitů, u těchto lokusů autoři stanovili 1–17 alel.

Celkem jsem testovala 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity a z toho jsem vyhodnotila 5 jako polymorfní lokusy: CAM-05, CAM-10, CAM-11, CAM-15 a CAM-24. Dawson *et al.* (2013) testovali všechny výše zmíněné lokusy při teplotě *annealingu* 56 °C. Testování lokusu CAM-05 provedli na 7 jedincích žebřičky pestré a našli 6 alel a 4 jedincích kura domácího a našli dvě alely. Já jsem testováním DNA 6 čápů při 60 °C našla 2 alely. Výsledkem testování lokusu CAM-10 na 12 jedincích žebřičky pestré bylo 6 alel a kura domácího byla pouze 1 alela. Mně se podařilo nalézt alely 2 při 48 °C. Lokus CAM-11 autoři testovali na 12 jedincích žebřičky pestré a našli 6 alel a u 4 jedinců kura domácího našli 1 alelu. Já jsem detekovala 2 alely při stejné teplotě *annealingu* 56 °C, kterou určili autoři. Pro lokus CAM-15 bylo nalezeno 6 alel u 12 jedinců žebřičky pestré a 2 alely u kura domácího. Já jsem testováním 6 čápů při teplotě 50 °C našla 2 alely. Pro lokus CAM-24 našli 6 alel testováním 12 jedinců žebřičky pestré a 4 jedinců kura domácího, kde detekovali 1 alelu. Já jsem našla u čápa bílého 2 alely a T_A jsem optimalizovala na 60 °C. Dawson *et al.* (2013) testovali všech 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů také na 4 jedincích každého z 8 druhů pěvců a 1 jedince každého ze 4 ostatních druhů ptáků. U pěvců detekovali 19 polymorfních lokusů alespoň u 4 z 8 testovaných druhů ptáků. To nasvědčuje velké univerzálnosti použití těchto mikrosatelitů. Tyto mikrosatelity by měly být více univerzálnější, než EST mikrosatelity, jelikož jsou izolovány z celého genomu a ne jen z EST sekvencí, jako je tomu u EST mikrosatelitů.

Řada prací využila ke *cross-species* PCR amplifikaci také mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity. Tyto mikrosatelity však testovali na DNA 6 nepříbuzných jedincích dalších druhů ptáků pocházejících z kladu Aequorlitorornithes (Tabulka 8).

K testování *cross-species* PCR amplifikace použila Filipová (2016) 171 párů primerů navržených pro mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity. Testování provedla na DNA 6 nepříbuzných jedincích potápky roháče (*Podiceps cristatus*) a detekovala 19 polymorfních mikrosatelitových lokusů. 6 lokusů bylo polymorfních pro mikrosatelity 2 druhů z řádu tučňáci, 8 EST ptačích mikrosatelitů a 5 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. 5 polymorfních lokusů se shodovalo s mojí prací (Tabulka 8).

Zlochová (2017) použila stejné páry primerů jako Filipová (2016). Testováním 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) našla celkem 23 polymorfních produktů. 16 z nich pocházelo od 6 druhů tučňáků, konkrétně 6 mikrosatelitů od tučňáka žlutorohého, 3 mikrosatelity od t. nejmenšího, 3 mikrosatelity od t. žlutookéh, 2 mikrosatelity od t. brýlového a po jednom mikrosatelitu od t. uzdičkového a od t. Humboldtova. Z univerzálních ptačích mikrosatelitů byly polymorfní 3 EST mikrosatelity a 4 byly konzervované ptačí mikrosatelity. Celkem 5 stejných polymorfních lokusů jsem také detekovala ve své práci, 3 z nich dokonce se stejným počtem alel (Tabulka 8).

Klaczová (2018), Adámková (2019) a Kremlová (2019) provedly *cross-species* PCR amplifikace se stejnou sadou primerů jako tato práce, tedy 113 párů primerů pocházejících od řádu tučňáci, 36 párů primerů navržených pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů navržených pro konzervované ptačí mikrosatelity.

S touto sadou primerů Klaczová (2018) detekovala celkem 24 polymorfních lokusů testováním na DNA plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*), 6 z nich bylo polymorfních zároveň u čápa bílého (Tabulka 8). Adámková (2019) získala 12 polymorfních produktů na DNA pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), ve své práci jsem stanovila 3 stejné polymorfní lokusy (Tabulka 8). Kremlová (2019) získala prostřednictvím 34 párů primerů celkem 35 polymorfních produktů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Pouze v jednom polymorfním lokuse jsme se shodovaly (Tabulka 8).

Tabulka 8: Srovnání polymorfních mikrosatelitových lokusů pocházejících z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity, které byly testovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého a dalších 5 prací, které použily DNA dalších druhů ptáků pocházejících z kladu Aequorlornithes. V tabulce je uveden název lokusu, číslem je vyznačen počet alel nalezený na daném lokusu, písmeno M značí monomorfní produkt.

lokus	zdrojový druh					
	čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>) tato práce	pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>) Kremlová (2019)	pelikán africký (<i>Pelecanus rufescens</i>) Adámková (2019)	plameňák růžový (<i>Phoenicopterus roseus</i>) Klaclová (2018)	plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>) Zlochová (2017)	potápka roháč (<i>Podiceps cristatus</i>) Filipová (2016)
Ech020	2	M	M	M	M	M
Ech030	2	M	M	3	3	M
Sh2Ca12	2	M	M	M	M	M
Pyga 16	2	M	M	M	M	M
Em8	3	M	5	4	M	M
Em14	2	M	M	M	M	3
Emm8	2	M	3	M	M	M
Man27	2	M	M	3	2	M
RM6	2	M	M	3	M	M
TG01-124	2	M	M	M	M	M
TG03-002	2	M	M	M	2	3
TG03-098	2	M	M	M	M	2
TG08-24(1)	2	M	M	M	M	M
TG13-017	2	M	M	M	M	M
CAM-05	2	2	M	M	M	M
CAM-10	2	M	M	M	M	M
CAM-11	2	M	M	2	2	5
CAM-15	2	M	M	M	M	M
CAM-24	2	M	2	6	4	4

V laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci se testování DNA čápa bílého věnovala také diplomová práce Burianové (2011). Z testovaných 210 párů primerů, které byly odvozeny od taxonomicky příbuzných druhů pocházejících z řádů brodivých, dlouhokřídlých, plaměňáků, potáplic a veslonožých, našla 14 polymorfních lokusů (Tabulka 9). Tyto polymorfní lokusy testovala společně s 20 polymorfními mikrosatelitovými lokusy nalezenými v předchozí práci (Obručová, 2009) na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého.

Tabulka 9: Seznam 14 nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého v diplomové práci Burianová (2011). V tabulce je uveden název polymorfního mikrosatelitového lokusu, řád a zdrojový druh, ze kterého byl původně izolován a příslušná citace.

lokus	řád	zdrojový druh	citace	
Ae27	brodiví	volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)	Huang <i>et al.</i> (2010)	
Er21, Er44		volavka červená (<i>Egretta rufescens</i>)	Hill <i>et Green</i> (2011)	
Apy06	dlouhokřídlí	alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	Dawson <i>et al.</i> (2005)	
PrA110, PrD3	plaměňáci	plaměňák růžový (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	Geraci <i>et al.</i> (2010)	
P3A3, P3D7	veslonoží	faeton běloocasý (<i>Phaethon lepturus</i>)	Humeau <i>et al.</i> (2010)	
COR28		kormorán ušatý (<i>Phalacrocorax auritus</i>)	Fike <i>et al.</i> (2009)	
Fmin13		fregatka malá (<i>Fregata minor</i>)	Dearborn <i>et al.</i> (2008)	
BOOB-RM4-F11		terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	Fairecloth <i>et al.</i> (2009)	
Sn2A-36, Sn2B-83				Taylor <i>et al.</i> (2010)
Eru03		ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Santos <i>et al.</i> (2006)	

Diplomová práce Fišerové (2014) se zabývala charakteristikou polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u čápa bílého, č. černého a č. simbila. K amplifikaci DNA čápa bílého použila páry primerů původně navržené pro potápku západní z řádu potápky, čápa východního a volavku rusohlavou z řádu brodiví. Z celkového počtu 31 testovaných párů primerů našla pro čápa bílého 5 polymorfních mikrosatelitů (Tabulka 10).

Tabulka 10: Seznam 5 nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého v diplomové práci Fišerová (2014). V tabulce je uveden název polymorfního mikrosatelitového lokusu, řád a zdrojový druh, ze kterého byl původně izolován a příslušná citace.

lokus	řád	zdrojový druh	citace
Cbo108, Cbo 109, Cbo151, Cbo168	brodiví	čáp východní (<i>Ciconia boyciana</i>)	Wang <i>et al.</i> (2011)
B112B	potápky	potápka západní (<i>Aechmophorus occidentalis</i>)	Humple (2009)

7 Závěr

V této bakalářské práci jsem pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace hledala u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého (*Ciconia ciconia*) polymorfní mikrosatelitové lokusy. Využila jsem 113 párů primerů navržených pro mikrosatelitové lokusy od 9 druhů z řádu tučňáci. 28 pro tučňáka nejmenšího, 25 bylo navrženo pro t. žltorohého, 16 pro t. uzdičkového, 13 pro t. Humboldtova, , 12 pro t. žlutookého, 9 pro t. brýlového, 6 pro t. kroužkového, 3 pro t. galapážského a 1 pro t. magellanského. 36 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů bylo navrženo pro konzervované ptačí mikrosatelity.

Po provedení PCR amplifikace mi všech 173 párů použitých primerů poskytlo hodnotitelné PCR produkty. 154 z nich bylo monomorfních a 19 jsem detekovala jako polymorfní lokusy. 9 párů primerů mikrosatelitů z řádu tučňáci mi poskytlo polymorfní lokusy, což představuje 7,98% úspěšnost. Až na jednu výjimku u mikrosatelitového lokusu Em8 se třemi alelami jsem u všech detekovala přítomnost 2 alel. 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů poskytlo shodně po 5 polymorfních lokusech od EST ptačích mikrosatelitů a 5 od konzervovaných ptačích mikrosatelitů, což představuje 16,66% úspěšnost. U všech univerzálních mikrosatelitů jsem detekovala po 2 alelách.

Pro tyto mikrosatelity jsem optimalizovala podmínky PCR amplifikace. Teplota *annealingu* se u polymorfních lokusů pohybovala v rozmezí 48–67 °C, doba elektroforetické separace byla 90–180 minut a byla provedena genotypizace jednotlivých polymorfních lokusů.

8 Seznam použité literatury

- Adámková V. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Ahlquist J.E., Sibley C.G. (1987): DNA hybridization evidence of hominoid phylogeny: results from an expanded data set. *Journal of Molecular Evolution*, 26: 99–121.
- Ahmed S., Hart T., Dawson D.A., Horsburgh G.J., Trathan P.N., Rogers A.D. (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.
- Akst E., Boersma P., Fleischer R. (2002): A comparison of genetic diversity between the Galapagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3: 375–383.
- Avise J.C., Johns G.C. (1999): Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification for extant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 7358–7363.
- Beattie B.C. (2019): Penguins. Salem Press Encyclopedia of Science, Ipswich.
- Barnatchez L., Duchesne P. (2000): Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 57: 1–12.
- Billing T.M., Guay P.J., Peucker A.J., Mulder R.A. (2007): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the study of paternity and population structure in the little penguin *Eudyptula minor*. *Molecular Ecology Notes*, 7: 425–427.
- Bledsoe A.H. (1987): Estimation of phylogeny from molecular distance data: the issue of variable rates. *The Auk: Ornithological Advances*, 104: 563–565.
- Boessenkool S., King T.M., Seddon P.J., Waters J.M. (2008): Isolation and characterization of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources*, 8: 1043–1045.
- Bradford A. (2014): Penguins Facts: Species and Habits. Live Science: The most Interesting Articles, Mysteries and Discoveries. Navštíveno dne 18. 6. 2020 na <https://www.livescience.com/27434-penguin-facts.html>.
- Burianová E. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Burleigh J.E., Kimbal R.T., Braun E.L. (2015): Building the avian tree of life using a large-scale, sparse supermatrix. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 84: 53–63.
- Burnie D. (2002): Zvíře. Obrazová encyklopedie živočichů všech kontinentů. Knižní klub, Praha.

- Cepák J., Chvapil S., Bělka T., Viktora L. (2014): Pták roku 2014, čáp bílý, čáp černý. Ptačí svět XXI, 1: 17–18.
- Dallimer M. (1999): Cross-species amplification success of avian microsatellites in the redbilled quelea (*Quelea quelea*). *Molecular Ecology*, 8: 695–698.
- Dawson D.A., Ball A.D., Spurgin L.G., Martín-Gálvez D., Stewart I.R.K., Horsburgh G.J., Burke T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomic*, 14: 176.
- Dawson D.A., Hanotte O., Greig C., Stewart I.R., Burke T. (2000): Polymorphic microsatellites in the blue tit *Parus caeruleus* and their cross-species utility in 20 songbird families. *Molecular Ecology*, 9: 1941–1944.
- Dawson D.A., Horsburgh G.J., Küpper C., Stewart I.R.K., Ball A.D., Durrant K.L., Hansson B., Bacon I., Bird S., Klein A., Krupa A.P., Lee J.W., Gálvez D.M., Simeoni M., Smith G., Spurgin L.G., Burke T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility - as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10: 475–494.
- Dawson D.A., Hunter F.M., Pandhal J., Buckland R., Parham A., Jones I.L., Bradshaw M., Jehle R., Burke T. (2005): Assessment of 7 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5–15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes*, 5: 289–297.
- Dearborn D.C., Hailer F., Fleisher R.C. (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: *Fregatidae*). *Molecular Ecology Resources*, 8: 1399–1401.
- Delsuc F., Brinkmann H., Philippe H. (2005): Phylogenomics and the reconstruction of the tree of the life. *Nature Reviews Genetics*, 6: 361–375.
- Dungel J., Hudec K. (2001): Atlas ptáků České a Slovenské republiky. Academia, Praha.
- Ellegren H. (1992): Polymerase-Chain reaction (PCR) analysis of microsatellites – a new approach to studies of genetic relationships in birds. *The Auk: Ornithological Advances*, 109: 886–895.
- Faircloth B.C., Ramos A., Drummond H., Gowaty P.A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *Conservation Genetic Resources*, 1: 159–162.
- Fike J.A., Devault T.L., Rhodes O.E. (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources*, 9: 1138–1185.
- Filipová K. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

- Fišerová, E. (2014): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), černého (*C. nigra*) a simbila (*C. abdimii*). Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Formánek J. (1994): Pták roku 1994. Čáp bílý. Česká společnost ornitologická, Praha.
- Gaisler J., Zima J. (2018): Zoologie obratlovců. Academia, Praha.
- Galbusera van Dodgen P.S., Matthysen E. (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics*, 1: 163–168.
- Geraci J., Gaillard M., Bechet A., Cezilly F., Wattier R.A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Goldstein D.B., Pollock D.D. (1997): Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, 88: 335–342.
- Grosser S., Waters J.M. (2015): Development and characterisation of 20 novel microsatellite markers for the little blue penguin (*Eudyptula minor*) using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 7: 143–145.
- Gyalus A., Végvári Z., Csörgö T. (2018): Changes in the nest sites of White Stork (*Ciconia ciconia*) in Hungary. *Ornis Hungarica*, 26: 65–88.
- Hanzák J. (1974): Velký obrazový atlas ptáků. Artia, Praha.
- Hanzák J., Hudec K. (1963): Světem zvířat. II. díl – 1. část, Ptáci. Státní nakladatelství, Praha.
- Hill A., Green M.C. (2011): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources*, 3: 13–15.
- Hoare B., Burnie D., (2008): Ptáci. Obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha.
- Huang X., Zhou X., Chen M., Chen X., Fang W. (2010): Isolation of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics*, 11: 1211–1214.
- Hudec K., Šťastný K. (1994): Fauna ČR a SR, svazek 27, Ptáci–Aves Díl I., Academia, Praha.
- Hughes C.R., Kavlie R., Johnson K. (1998): Characterization of polymorphic trinucleotide microsatellite loci in the great-tailed grackle, *Quiscalus mexicanus*. *Molecular Ecology*, 7: 783–784.
- Humeau L., Da Silva D., Guérin F., Jaquement S., Requier J.B., Le Corne M. (2010): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Pheathon lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources*, preprint.

- Humple D.L. (2009): Genetic structure and demographic impacts of oil spills in western and clark's grebe. Diplomová práce. Sonoma State University, USA.
- Kahl M.P. (1979): Suborder Ciconiae, family Ciconiidae. Cambridge: Museum of Comparative Zoology, 1: 245–253.
- Kang S., Jung J.W., Ahn D.H., Lee J.E., Kim J.H., Park H. (2015): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Chinstrap penguin, *Pygoscelis antarctica*. Conservation Genetics Resources, 7: 561–563.
- Klaclová M. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Kotouč O.L. (2004): *Ciconia ciconia*. Navštíveno z: www.priroda.cz dne 12. 1. 2020.
- Kremlová H. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Labuschagne C., van Wyk A.M., Kotzé A., Grober P., Dalton D.L. (2013): Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). Conservation Genetics Resources, 5: 169–171.
- Moore S.S., Sargeant L.L., King T.J., Mattick J.S., Georges M., Hetzel D.J.S. (1991): The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. Genomics, 10: 654–660.
- Obručová E. (2009): Polymorfni DNA mikrosatelity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Parker P.G., Snow A.A., Schug M.D., Booton G.C., Fuerst P.A. (1998): What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. Ecology, 79: 361–382.
- Primmer C.R., Møller A.P., Ellegren H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. Molecular Ecology, 5: 365–378.
- Primmer C.R., Painter J.N., Koskinen M.T., Palo J.U., Merila J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. Journal of Avian Biology, 36: 348–360.
- 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.
- Proctor N.S., Lynch P.J. (1993): Manual of ornithology: avian structure and function. Yale university Press. Yale.

- 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 next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526: 569–573.
- Queller D.C. (1993): Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution*, 8: 285–288.
- Rassmann K., Schlötterer C., Tautz D. (1991): Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12: 113–118.
- Roeder A.D., Marshall R.K., Mitchelson A.J., Visagathilagar T., Ritchie P.A., Love D.R., Lambert D.M. (2001): Geneflow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10: 1645–1656.
- Royara de Souza Oliviera P.R., Donatelli R.J., Neves A.S., Chagas Vieira Santos F., Santos S.S., Santos Nascimento M., Bolzani de Campos Ferreira G.J., Guzzi A. (2019): Compared cranial osteology of species of *Leptotilus*. *Agricultural Journal*, 10: 232–243.
- Santos M.S., Gonçalves E.C., Barbosa M.S.R., Silva A., Schneider M.P.C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes*, 307–309.
- Sibley C.G., Ahlquist J.E., Monroe B.L. (1988): A classification of the Living Birds of the World Based on DNA-DNA Hybridization Studies. *The Auk: Ornithological Advances*, 105: 409–423.
- Scribner K.T., Pearce J.M. (2000): Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population, and phylogenetic levels. *Molecular Methods in Ecology*, 235–273.
- Sheldon F.H., Slikas B. (1997): Advances in Ciconiiform systematics 1976–1996. *Colonial Waterbirds*, 20: 106–114.
- Schlosser J.A., Dubach J.M., Garner T.W.J., Araya B., Bernal M., Simeone A., Wallace R.S. (2009): Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetics*, 10: 839–849.
- Schlosser J.A., Dubach J.M., Garner T.W.J., McElligott A.G. (2003): Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, 3: 62–64.
- Schlötterer C. (1998): *Microsatellites*. IRL, Oxford.
- Schlötterer C., Amos W., Tautz D. (1991): Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, 354: 63–65.
- Snustad D.P., Simmons M.J. (2017): *Genetika*. Druhé aktualizované vydání. Masarykova univerzita, Brno.

- Soltis D.E., Mort M.E., Latvis M, Mavrodiev E.V., O'Meara B.C., Soltis P.S., Burleigh J.G., de Casa R.R. (2013): Phylogenetic relationships and character evolution analysis of Saxifragales using a supermatrix approach. *American Journal of Botany*, 100: 916–929.
- Svensson L., Grant P.J. (2004): Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého východu. Praktická určovací příručka. Svojtka & Co., Praha.
- Šťastný K., Hudec K. (2016): Ptáci – Aves, 3. vydání. Academia, Praha.
- Šťastný K., Bejček V., Hudec K. (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros, Praha.
- Tautz D., Renz M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12: 4127–4138.
- Tautz D., Trick M., Dover G.A. (1986): Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322: 652–656.
- Taylor S.A., Morris-Pocock J.A., Sun Z., Friesen V.L. (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology*, 151: 525–528.
- Tóth G., Gáspári Z., Jurka J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967–981.
- Vianna J.A., Noll D., Mura-Jornet I., González-Acuña D., Navarro C., Loyola D.E., Dantas G.P.M. (2017): Comparative genome-wide polymorphic microsatellite markers in Antarctic penguins through next generation sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, 40: 676–687.
- Wang H., Lou X., Zhu Q., Huang Y., Zhou L., Zhang B. (2011): Isolation and Characterization of Microsatellite DNA Markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science*, 28: 606–608.
- Zane L., Bergelloni L., Patarnello T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1–16.
- Zhang D.X., Hewitt G.M. (2003): Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12: 563–584.
- Zhang L., Wang L., Gowda V., Wang M., Li X., Kan X. (2012): The mitochondrial genome of the Cinnamon Bittern, *Ixobrychus cinnamomeus* (Pelicaniformes: Ardeidae): sequence, structure and phylogenetic analysis. *Molecular Biology Reports*, 39: 8315–8326.
- Zlochová A. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopiterus ruber*). Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.