

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2023

Bc. Petra Krňávková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza a charakteristika vybraných polymorfních
mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého
(*Ciconia ciconia*)**

Diplomová práce

Bc. Petra Krňávková

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra KRŇÁVKOVÁ**
Osobní číslo: **R210600**
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého (*Ciconia ciconia*).**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Amplifikace a charakteristika vybraných mikrosatelitových lokusů na DNA 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfní v bakalářské práci Krňávková, P. (2021): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce (Dep. in: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
Rozsah práce 60 stran

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

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

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Petr Nádvořík, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: 4. listopadu 2021
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Bc. Petra Krňávková
Název práce:	Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého (<i>Ciconia ciconia</i>)
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023
Souhrn:	

Tato diplomová práce se věnuje analýze a charakteristice vybraných polymorfních mikrosatelitů, které byly nalezeny u čápa bílého (*Ciconia ciconia*) prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace.

Teoretická část se zabývá systémem recentních ptáků, dále popisem čápa bílého, jeho chováním, migrací, hnízděním, systémem páření, potravou, karyotypem a charakterizací heterochromatinu. Další kapitoly se zabývají charakteristikou mikrosatelitů, dále pak mikrosatelity u druhů z čeledi čápovití, a to těmi které byly popsány *de novo* a také pomocí *cross-species* PCR amplifikace.

Experimentální část se zabývá *cross-species* PCR amplifikací s použitím 18 párů primerů, které byly nalezeny u zástupců z řádu trubkonosí a poskytly polymorfní produkt v mé bakalářské práci (Krňávková, 2021). Tyto páry primerů byly testovány na genomické DNA 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého a 17 z nich poskytlo polymorfní produkt. Všechny lokusy byly charakterizovány na základě populačně-genetických parametrů a žádná dvojice mikrosatelitů není ve vazbě.

Klíčová slova:	Čáp bílý, mikrosatelity, <i>cross-species</i> PCR amplifikace, <i>Ciconia ciconia</i> , trubkonosí
Počet stran:	66
Počet příloh:	1
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's name and surname: Bc. Petra Krňávková

Title: The analysis and characterization of selected polymorphic microsatellites from order Procellariiformes in White Stork (*Ciconia ciconia*)

Type of thesis: Master

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

Supervisor: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Summary:

This master thesis is devoted to the analysis and characterization of selected polymorphic microsatellites that were found in the white stork (*Ciconia ciconia*) through cross-species PCR amplification.

The theoretical part is dealing with the system of recent birds, further is describing the white stork, its behavior, migration, nesting, mating system, food, karyotype and characterization of heterochromatin. Other chapters deal with the characteristics of microsatellites, then microsatellites in species from the stork family, namely those that have been described de novo and also by means of cross-species PCR amplification.

The experimental part deals with cross-species PCR amplification using 18 primer pairs, which were found in representatives of the order of Procellariiformes and provided a polymorphic product in my bachelor thesis (Krňávková, 2021). These primer pairs were tested on the genomic DNA of 23 unrelated white stork individuals and 17 of them gave a polymorphic product. All loci were characterized on the basis of population-genetic parameters and no pair of microsatellites is linked.

Keywords: White stork, microsatellites, cross-species PCR amplification, *Ciconia ciconia*, Procellariiformes

Number of pages: 66

Number of appendices: 1

Language: Czech

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

V Olomouci dne 28. 4. 2023

.....

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Petru Nádvořníkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, veškerou pomoc, ochotu a čas, který mi věnoval při zpracování teoretické a experimentální části této diplomové práce.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Systém ptáků.....	3
3.2	Čáp bílý	3
3.2.1	Migrace.....	5
3.2.2	Hnízdění	6
3.2.3	Systém páření.....	7
3.2.4	Potrava.....	8
3.2.5	Karyotyp a charakterizace heterochromatinu	10
3.2.6	Chování.....	11
3.3	Mikrosatelity	12
3.3.1	Mikrosatelity u druhů z čeledi čápovití	15
3.3.2	Polymorfní mikrosatelity popsané <i>de novo</i> u čápovitých	15
3.3.3	<i>Cross-species</i> mikrosatelity u druhů z čeledi čápovití	18
4	Materiál a metody	20
4.1	Biologický materiál	20
4.2	Polymorfní mikrosatelitní lokusy u čápa bílého	20
4.3	PCR amplifikace genomické DNA čápa bílého.....	21
4.4	Elektroforetická separace PCR produktů	22
4.5	Statistické vyhodnocení výsledků	24
4.6	Použité chemikálie	25
4.7	Použité roztoky a jejich příprava	26
4.8	Použité laboratorní přístroje	27
5	Výsledky	29
6	Diskuse.....	36
7	Závěr.....	46
8	Literatura	47
9	Příloha	55

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Výběr makrochromozomů z karyotypu samce čápa bílého dle Abu Shnaf <i>et Al-Khalifa</i> (2023).....	10
Obrázek č. 2: Idiogram makrochromozomů čápa bílého ilustrující pozici a velikost konstitutivního heterochromatinu podle Abu Shnaf <i>et Al-Khalifa</i> (2023).....	11
Obrázek č. 3: Elektroforetogram dvoualelového lokusu Oc28B u 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého.....	34
Obrázek č. 4: Elektroforetogram čtyřalelového lokusu Ptero02 u 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého.....	35
Obrázek č. 5: Elektroforetogram pětialelového lokusu Pacbel_07265 u 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého.....	35
Obrázek č. 6: Procentuální zastoupení 76 polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa bílého, vzhledem k jejich zdrojovému řádu ve starém pojetí systému.....	43
Obrázek č. 7: Srovnání procentuálního zastoupení párů primerů amplifikujících mikrosatelity z řádů trubkonosí a dlouhokřídli u tří druhů rodu <i>Ciconia</i>	44
Obrázek č. 8: Polymorfní mikrosatelity pocházející od druhů z řádů trubkonosí a dlouhokřídli, které byly polymorfní u tří druhů rodu <i>Ciconia</i> : (čáp bílý (tato práce), čáp černý (Musilová, 2022) a čáp simbil (Kopecký, 2022)).....	45

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Seznam 18 mikrosatelitních lokusů odvozených od druhů z řádu trubkonosí, které byly označeny jako polymorfní u čápa bílého v mé bakalářské práci (Krňávková, 2021).	20
Tabulka č. 2: Složení PCR reakční směsi pro 23 vzorků.	21
Tabulka č. 3: Teplotní a časový profil PCR reakce.	22
Tabulka č. 4: Charakteristika 17 polymorfních mikrosatelitů, které byly genotypovány u 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého	31
Tabulka č. 5: Polymorfní mikrosatelitní lokusy testované na DNA 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého.....	33
Tabulka č. 6: Srovnání mikrosatelitních lokusů, které byly původně nalezeny u níže zmíněných zdrojových druhů s výsledky <i>cross-species</i> PCR amplifikace na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého	39
Tabulka č. 7: Přehled mikrosatelitních lokusů z řádu trubkonosí, které jsou polymorfní u čápa bílého (tato práce) a u dalších 10 druhů z kladu Aequorlitorneithes, u kterých byly tyto mikrosatelity také testovány.	41

1 Úvod

Čáp bílý je jedním z největších evropských ptáků, je asi metr vysoký s rozpětím křídel přibližně 2 metry. Jeho zbarvení je převážně bílé, pouze letky má černé. Má dlouhý červený zobák a dlouhé červené nohy. Na rozdíl od volavek má čáp bílý při letu krk i nohy natažené. Čáp bílý je rozšířen ve velké části evropských zemí, a to převážně v Polsku a Španělsku, ale také v oblasti Balkánu. Hnízdí na většině území České republiky.

Mikrosatelity jsou jednoduché opakující se sekvence, které jsou složeny z tandemově opakujících se jednotek o délce 1–6 bp. Vyskytují se v eukaryotických i prokaryotických genomech. Jsou využívány jako genetické markery a díky svým typickým vlastnostem (multialelické, kodominantní a vysoce polymorfní) jsou vhodné například pro studium populační struktury, testování paternity nebo mapování genomu. Pro mikrosatelity je typická vysoká rychlost mutace.

V této diplomové práci se budu věnovat analýze a charakteristice 18 párů primerů, které poskytly polymorfní produkt v mé bakalářské práci (Krňávková, 2021) a to na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Amplifikace a charakteristika vybraných mikrosatelitových lokusů na DNA 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfní v mé bakalářské práci (Krňávková, 2021).

3 Literární přehled

3.1 Systém ptáků

Ptáky (Aves) lze rozdělit na podtřídu běžci (Palaeognathae), zahrnující řády pštrosi (Struthioniformes), nanduové (Rheiformes), kiviové (Apterygiformes), kasuáři (Casuariiformes) a tinamy (Tinamiformes). Sesterskou skupinou k běžcům je podtřída letci (Neognathae). Do Neognathae se řadí dva klady Galloanserae a Neoaves. Do nadřádu Galloanserae patří řády hrabaví (Galliformes) a vrubozobí (Anseriformes). Nadřád Neoaves má bazální nevyřešenou polytomii nejméně 9 řádů, z nichž některé (Telluraves a Aequornithes) jsou nadřazené skupiny a některé z nich např. Opisthocomiformes jsou řádem bez blízkých příbuzných. Součástí nadřazené skupiny vodních ptáků Aequornithes jsou řády potáplice (Gaviiformes), trubkonosí (Procellariiformes), tučňáci (Sphenisciformes), terejové (Suliformes), veslonozí (Pelecaniformes) a čápi (Ciconiiformes) (Gill *et al.*, 2023). Sangster *et Mayr* (2021) ve své studii použili název Feraequornithes pro klad tvořený řády Procellariiformes, Sphenisciformes, Ciconiiformes, Suliformes a Pelecaniformes.

Řád čápi (Ciconiiformes) zahrnuje pouze čeleď čápovití s 6 rody a s celkově 19 druhy a to: *Mycteria*, *Anastomus*, *Ciconia*, *Ephippiorhynchus*, *Jabiru* a *Leptoptilos*. Do rodu *Mycteria* patří nesyť africký, americký, bílý a indomalajský. Rod *Anastomus* zahrnuje zejzoba afrického a asijského. Čáp bílý patří do rodu *Ciconia*, společně s čápem bělokrkým, černým, jihoamerickým, pestrým, simbilem a východním. Do rodu *Ephippiorhynchus* se řadí čáp černokrký a sedlatý. Rod *Jabiru* obsahuje jeden druh, a to čápa jabiru. A do posledního rodu *Leptoptilos* se řadí marabu africký, indický a indomalajský (Gill *et al.*, 2023).

3.2 Čáp bílý

Čáp bílý je velký stěhovavý pták, který je převážně bíle zbarvený, pouze na křídlech má černá pera (Rubaiee *et al.*, 2021). Dospělci mají dlouhé červené nohy a dlouhé špičaté červené zobáky (Abu Shnaf *et Al-Khalifa*, 2023). Tento druh má extrémně velký areál rozšíření, populační trend se zdá být rostoucí a velikost populace je velmi velká, z těchto důvodů je druh hodnocen jako nejméně znepokojivý. Velikost světové populace se odhaduje přibližně na 700 000 jedinců. Evropská populace se odhaduje na necelých 250 000 párů (BirdLife International, 2023).

Evropská populace čápa bílého využívá dvě různé letové trasy a rozchází se do východních a západních migračních proudů. V minulosti byla populace žijící v západní

a severní Evropě vystavena dramatickému úbytku populace. V polovině 50. let byla zahájena řada nezávislých reintrodukčních programů s cílem přivést čápy zpět do historických areálů (Švýcarsko, Francie, Německo, Nizozemí a Švédsko). Zakládající jedinci pocházeli z evropských zemí a Alžírsko, což vedlo k významnému umělému mísení mezi východními a západními trasami. Snížená početnost jedinců v rámci populace je spojena se změnou stanovišť včetně ztráty mokřadů, intenzifikací zemědělství a je také spojena s lovem, nadzemním elektrickým vedením, suchem v zimovištích a silnými dešti během období rozmnožování (Shephard *et al.*, 2013). Od konce 80. let se však počet jedinců neustále zvyšoval, zejména v Evropě. Dnes je populace čápů v České republice stabilní a světová populace je stále na vzestupu. Jeden z hlavních důvodů tohoto nárůstu souvisí s přizpůsobením se používání skládek jako potravinového zdroje (Pineda-Pampliega *et al.*, 2021).

Tento druh obývá otevřené oblasti, obecně se vyhýbá oblastem s přetrvávajícím chladným, vlhkým počasím nebo velkým plochám vysoké a husté vegetace, jako jsou rákosové porosty nebo lesy. Během zimy preferuje suchá stanoviště, například pastviny, stepi, savany a obdělávaná pole. Často se také shromažďuje v blízkosti jezer, rybníků, pomalu tekoucích potoků, příkopů anebo řek (BirdLife International, 2023). V létě preferuje sladkovodní stanoviště, jako jsou vlhké pastviny, záplavové oblasti, bažiny, jezera a rýžová pole (Abu Shnaf *et Al-Khalifa*, 2023).

Druh je ohrožen změnami stanovišť včetně odvodňování vlhkých luk, prevencí povodní v záplavových územích (přehrad, násypů a přečerpávacích stanic), přeměnou krmných ploch, rozvojem, industrializací a intenzifikací zemědělství (Golawski *et Kasprzykowski*, 2021). Je ohrožen i nedostatkem hnízdišť v některých oblastech. Během zimy může v Africe docházet k vysoké míře úmrtnosti změnou dostupnosti potravy v důsledku sucha, desertifikace a kontroly populací sarančat pomocí insekticidů. Další hrozbou je kolize a usmrcení elektrickým proudem z nadzemního elektrického vedení, zejména při migraci v Evropě. Druh je loven pro potravu a sport, především při migraci a v zimovištích. Vzhledem ke zvyku tohoto druhu vykonávat potřebu na nohách, aby si reguloval svoji tělesnou teplotu v horkém podnebí se nedoporučuje vybavovat jedince kroužky na nohách pro účely identifikace (suchá kyselina močová se hromadí na nohách a ztvrdne kolem kroužků, čímž je utáhne a vede to ke zranění). Proto se doporučují jiné metody monitorování, jako jsou satelitní telemetrie anebo štítky umístěné na křídlech (Patagial tags). Celková populace druhu je sčítána a monitorována každých 10 let (BirdLife International, 2023).

3.2.1 Migrace

Čáp bílý je palearktický, sociální migrant, který je široce rozšířen po celém evropském kontinentu, až na východ po Bělorusko a Ukrajinu a na sever až do jižní Skandinávie, a také na jih od Středozemního moře, kde jsou hnízdící populace v severním Alžírsku, Maroku a Tunisku (Loucif *et al.*, 2022). Oblast rozšíření se rozprostírá od severní Afriky a Pyrenejského poloostrova až po západní části Asie (Arslangümdoğdu *et al.*, 2017).

V populaci střední a západní Evropy se ptáci stěhují do svých západoafrických zimovišť přes Gibraltarský průliv, ptáci z východní Evropy migrují přes Turecko a Střední východ a zimují ve východní a jižní Africe. V rámci západního Turecka se migrace soustřeďuje do tří oblastí: průliv Dardanely na západě, poloostrov Kapıdağ ve střední části Marmarského moře a Bosporský průliv na východě (Shephard *et al.*, 2013; Arslangümdoğdu *et al.*, 2021). Populace severní Afriky, stejně jako západní populace se zaměřují na oblast Sahelu v Africe jako na svou přezimovací oblast (Loucif *et al.*, 2022). Při migraci do subsaharských zimovišť překračují tři geografické bariéry: Gibraltarský průliv, pohoří Atlas a saharskou poušť (Marcelino *et al.*, 2023).

Povětrnostní podmínky, jako je teplota, směr a rychlost větru a srážky ovlivňují migrační vzorce a přesnou trasu migrace, zvláště když povětrnostní podmínky narušují tvorbu stoupavých proudů. Čápi se mohou v důsledku toho odchýlit od svých obvyklých tras (Arslangümdoğdu *et al.*, 2017). V posledních letech se vysoké procento čápů v zimě zdržuje také v jihozápadní Evropě (Bjedov *et al.*, 2021), pravděpodobně kvůli zvýšené celoroční dostupnosti potravy na skládkách a stále teplejším zimám (Marcelino *et al.*, 2023).

Během migrace se u většiny ptáků střídají období aktivní migrace a období odpočinku, běžně nazývaná mezipřistání. Ptáci tento čas využívají k zotavení a doplnění potravy, k sociálním interakcím a čekáním na vhodné povětrnostní podmínky pro další migraci. Výběr mezipřistání není náhodný, jednotlivci si vybírají oblasti s vysokou dostupností potravy. Délka mezipřistání může zvýšit pravděpodobnost predace a zpozdit přílet na zimoviště, což ohrozí šance na dosažení nejlepšího stanoviště, kde bude mít nejlepší dostupnost potravy a vhodné prostředí. Skládky poskytují rychlou a vysokou dostupnost potravy během migrace. Na těchto umělých zastávkách se v sezóně migrace shromažďují tisíce ptáků a jsou zvláště důležité, když změny klimatu omezují přístup k přirozeným místům pro nakrmení se. Celkově mladí čápi stráví v místech mezipřistání až jednu třetinu migrace. Skládky se většinou nacházejí dále od optimální trasy a také se

na nich čápi zdržují déle. Zatímco na východě je využití skládek zanedbatelné, na západě se čápi zastavují na delší dobu a intenzivně využívají umělých zdrojů potravy (Marcelino *et al.*, 2023).

Dospělá mláďata schopná zahájit migraci opouštějí svá hnízda několik dní předtím, než tak učiní rodiče. Dospělí ptáci odlétají o něco později, synchronně. Tímto způsobem rodiny nemigrují společně. Ptáci se shromažďují na loukách, pastvinách nebo polích, kde intenzivně shánějí potravu a poté se společně slétají na nocoviště. Čím déle tedy migrace probíhá, tím více se hejna zvětšují. Migrující obrovská hejna mají výhody. Snižují náročnost na migraci tím, že zvyšují možnost nalezení dobrých stoupavých proudů, což umožňuje čápům maximalizovat efektivitu letu. Velké hejno je také obratnější v optimalizaci rychlosti letu, kompenzaci vlivu větru a snížení odchylek od správného směru migrace (Bocheński *et Jerzak*, 2006).

3.2.2 Hnízdění

Čáp bílý je dlouhověký pták se silnou hnízdní věrností. Hnízdí v blízkosti lidí a staví si svá hnízda na stromech, střechách budov, komínech, pylonech, telegrafních sloupech, stohách slámy, elektrických stožárech a dalších člověkem vytvořených stavbách poblíž luk, rybníků a potoků (Rubaiee *et al.*, 2021). Čáp bílý hnízdí osamoceně nebo ve volných koloniích v rámci desítek až stovek jedinců (BirdLife International, 2023). Hnízda mají válcovitý tvar a během mnoha let používání mohou dosáhnout velikostí až 1,8 m na výšku a 2,0 m na šířku. Čápi hnízda jsou často v každé hnízdní sezóně znovu obsazovaná a přestavovaná stejným nebo jiným hnízdním párem (Zbyryt *et al.*, 2021). Po přiletu páry čápů přidávají do stávajících hnízd nový materiál, aby byla vhodná pro snůšku. Hnízda se proto časem stávají obrovskými a objemnými v důsledku nahromaděných klacíků, větviček, slámy a sena a někdy také antropogenního materiálu, jako jsou provázky, hadry, plastové fólie a papír (Rubaiee *et al.*, 2021). V důsledku rostoucí velikosti hnízda v průběhu let narůstá i jeho hmotnost, a to může způsobit závažné škody. Za celou sezónu rozmnožování přinesou do hnízda v průměru 64 kg různých materiálů (Zbyryt *et al.*, 2021).

Znovu používaná hnízda spolu s nahromaděnými výkaly mnoha jedinců jsou vhodným prostředím pro růst různých bakterií (Rubaiee *et al.*, 2021). Organický materiál shromážděný v průběhu několika let se časem mění na ornitogenní půdu s rozlišitelnými vrstvami s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a biochemickými aktivitami, která obsahuje bohaté stanoviště pro mikrobiální růst a také zde rostou bakterie u kterých se

s větší pravděpodobností mohou objevit bakteriální rezistence (Pineda-Pampliega *et al.*, 2021; Zbyryt *et al.*, 2021). Rezistentní bakterie může čáp také získat tím, že shání potravu na skládkách (Loucif *et al.*, 2022). Nárůst antibiotické rezistence je hrozbou pro veřejné zdraví a jejich vztah k ptačím druhům je zvláště nebezpečný kvůli potenciální úloze ptáků při jejich šíření, zejména v případě čápa bílého, protože má úzký vztah k přírodnímu nebo člověkem pozměněnému prostředí (Pineda-Pampliega *et al.*, 2021).

Obsazené hnízdo a jeho nejbližší okolí se stává územím, které se před ostatními čápy brání. Izolované hnízdící páry mohou bránit oblast o poloměru až několik stovek metrů, zatímco u kolonií může být obrana pouze v bezprostředním okolí hnízda. V hustých koloniích, kde jsou hnízda umístěna jedno vedle druhého, je bráněno pouze hnízdo. Samec se zpravidla více než samice podílí na obraně hnízda a okolního území. Čápi bílí se během doby hnízdění bojí jen několika predátorů. Nejdůležitější jsou velcí dravci jako jsou orli mořští, skalní a jestřábí. Poměrně často se uvádí, že tyto druhy čápy pronásledují nebo na ně útočí. Přítomnost dravců v blízkosti hnízda nebo kolonie téměř vždy vyvolává velmi silnou reakci. Mezi pozemními predátory může být hrozbou liška obecná, kuna obecná nebo kočka domácí. Zatímco ostatní čápi nejsou v blízkosti hnízda tolerováni, čápi jsou obvykle lhostejní k ostatním zvířatům, která nejsou predátory nebo potenciální kořistí. Nejčastějšími spoluobyteli hnízda jsou vrabec domácí, špaček obecný, konipas bílý a poštolka obecná, ti zde nacházejí vhodné prostory pro stavbu vlastního hnízda a přítomnost čápa může být výhodou proti predátorům (Bocheński *et Jerzak*, 2006).

3.2.3 Systém páření

Pár obvykle tvoří ptáci podobného věku. Na začátku hnízdní sezóny se na hnízdě jako první objevuje samec, partnerka dolétá až později. Dříve se vracejí starší ptáci, kteří jsou zkušenější. Navíc se často stejní ptáci tvořící pár setkávají na stejném hnízdě na více než jednu hnízdní sezónu (Bocheński *et Jerzak*, 2006).

Kopulace probíhá výhradně na hnízdě. Je vyvolána samcem a nepředchází jí žádné zvláštní chování. Obvykle těsně před tímto aktem samec přechází kolem samice, poté položí hlavu nebo krk samici na krk nebo na záda a mírně ji přitlačí. Poté vyleze na záda samice, pokrčí nohy, aby snížil tělo a zahájí kloakální kontakt. Během těchto námluv samec otírá peří samice svým zobákem, vrtí hlavou ze strany na stranu a tiše klope zobákem. Při kopulaci se ptáci snaží udržet rovnováhu částečným roztažením křídel. Celá kopulace trvá zpravidla 10–20 sekund. Stejně jako před kopulací nedochází ani po

dokončení aktu k žádnému zvláštnímu chování. První kopulace může nastat několik hodin nebo dokonce minut po přiletu a přijetí samice. Nejintenzivnější kopulace se provádějí v období tvorby páru a týden před začátkem kladení vajec. Čáp bílý patří do kategorie ptáků s velmi vysokou četností kopulace. Průměrný počet kopulací dosahuje cca 160 v prvních týdnech a nad 200 během celé hnízdní sezóny. Obvykle se většina kopulací provádí v ranních nebo večerních hodinách, s frekvencí až 2krát za hodinu. Párové pouto vzniká již během prvních dnů po přiletu samice. Přesto lze v této době pozorovat extrapárové kopulace (Bocheňski *et* Jerzak, 2006; Turjeman *et al.*, 2021).

Samice kladou vejce zpravidla každý druhý den. Inkubace začíná po snesení prvního nebo druhého vejce. Oba partneři se účastní inkubace, ale samice inkubací tráví více času než samec. Rodiče jsou zpravidla přítomni na hnízdě, když se líhnou mláďata, zejména za nepříznivých povětrnostních podmínek. K nejvyšší úmrtnosti a ztrátám dochází během prvních 2–3 týdnů života čápat. V této době potřebují zahřívát a hlídat rodiči. Během prvních 3–4 týdnů po vylíhnutí je v hnízdě téměř vždy přítomen alespoň jeden rodič. Později jsou čápata ponechána delší dobu bez dozoru. Během horkých a slunečných dnů nebo když prší, stojí rodiče na hnízdě nad čápaty v poloze se svěšenými křídly. Mláďata krmí oba rodiče, kdy jim potravu vyvrhnou ze žaludku nebo donesou ve voleti. Samec přináší zpravidla větší množství potravy než samice. Frekvence krmení a množství dodávané potravy během sezóny může záviset na mnoha faktorech, jako je stáří a velikost mláďat, populační hustota čápů na lokalitě, bohatost zdrojů potravy, povětrnostní podmínky, věk nebo zkušenosti rodičů. Mláďata jsou krmena až 16x za den. Během horkých letních dnů rodiče dodávají čápatům i vodu, obvykle po krmení, aby se nepřehřála (Bocheňski *et* Jerzak, 2006).

U čápů bílých je zcela běžně pozorována rodičovská infanticida. Dospělí vyhazují z hnízda vlastní vejce nebo mláďata (živá nebo mrtvá) a pokud jsou vylíhlá mláďata ještě malá, rodiče se je pokusí se sežrat anebo je spolknou. Tento jev se nazývá kronismus. Rodiče zpravidla zabíjí nejmenší a nejméně vyvinuté mládě. Je to pravděpodobně způsob, kdy rodiče aktivně redukují svůj odchov, přizpůsobují počet mláďat aktuálnímu dostatku potravy a vlastním silám a schopnostem odchovat mláďata (Bocheňski *et* Jerzak, 2006).

3.2.4 Potrava

Potrava čápů bílých se většinou skládá z různých bezobratlých (kobylinky, brouci, žížaly a koryši), obojživelníků, ryb, hadů, ještěrek a drobných savců (hraboši, myši, potkani a rejsci). Mláďata jsou krmena místními zdroji potravy, sháněnými rodiči, což

z nich činí vhodné bioindikátory kontaminantů v místním prostředí (Bjedov *et al.*, 2021; BirdLife International, 2023). Čáp bílý je navíc oportunista při hledání potravy využívající antropogenní zdroje, jako jsou skládky (Al Rubaiee *et al.*, 2021). Využívání skládek jako potravních zdrojů čápy bílými je v poslední době dobře známé chování. Výsledky studie provedené Pineda-Pampliega *et al.* (2021) ukázaly lepší tělesnou kondici u jedinců žijících se na skládkách ve srovnání s těmi, kteří se živili přírodními zdroji, ale také lepší nutriční stav, jak ukazují vyšší hladiny albuminu, cholesterolu a triglyceridů v plazmě. Jediné ukazatele negativních účinků využívání tohoto potravinového zdroje byly: vyšší procento methemoglobinu (metHb) v periferní krvi a přítomnost *E. coli* rezistentní na antibiotika.

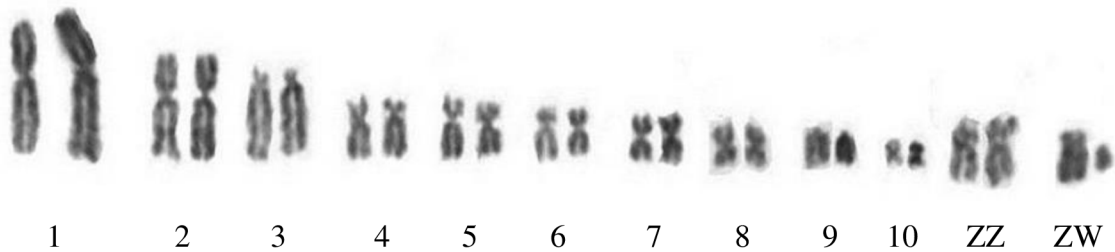
Krmení na skládkách zlepšuje tělesnou kondici, reprodukční zdatnost, přežití a početnost jedinců. Kromě toho použití tohoto zdroje potravy změnilo migrační vzorec některých jedinců, což vedlo ke kratší migrační vzdálenosti a zimování v Evropě nebo dokonce k úplné ztrátě migračního chování u některých jedinců. To umožňuje obsazování lepších hnízdních lokalit, což následně poskytuje dřívější nástup rozmnožování v rámci kalendářního roku, a to souvisí s většími snůškami a vyšší úspěšností rozmnožování. I když se celkově zdá, že používání skládek má na druhy pozitivní dopad, byly popsány i negativní aspekty. Na jedné straně potencionální fyzické poškození z přítomnosti skleněných střepů, kovových drátů, plastových úlomků, provázků a fólií. Fyzické poškození pozitím gumiček, zaměněných za žížaly, může ovlivnit vstřebávání živin, protože může uměle navodit pocit sytosti a jejich hromadění by také mohlo způsobit střevní neprůchodnost. Vystavení chemickým znečišťujícím látkám, jako jsou kovy a organické sloučeniny, může být důsledkem jejich přítomnosti v odpadech (Pineda-Pampliega *et al.*, 2021).

Čáp bílý používá mnoho různých strategií a metod lovu. Mezi nejčastější patří číhání a sběr kořisti. Při číhání čáp stojí nehybně vedle zvířecí nory, se skloněnou hlavou, zobákem směřujícím dolů, dívá se a čeká, až se objeví kořist. Sběr kořisti probíhá tak, že čáp pomalu chodí po louce nebo poli a sbírá ze země malá zvířata. Mezi další, ale málo používané metody patří chytání kořisti ve vodě, odchyt při letu nebo lovení plavajících ptáků (např. kachňat) (Bocheński *et Jerzak*, 2006).

Bylo zjištěno, že sekvenční (asynchronní) sečení travních porostů může čápmu usnadnit lov kořisti. Při lovu na sečených loukách čápi jednoduše chodí za žacími stroji a za pochodu sbírají potravu (Golawski *et Kasprzykowski*, 2021).

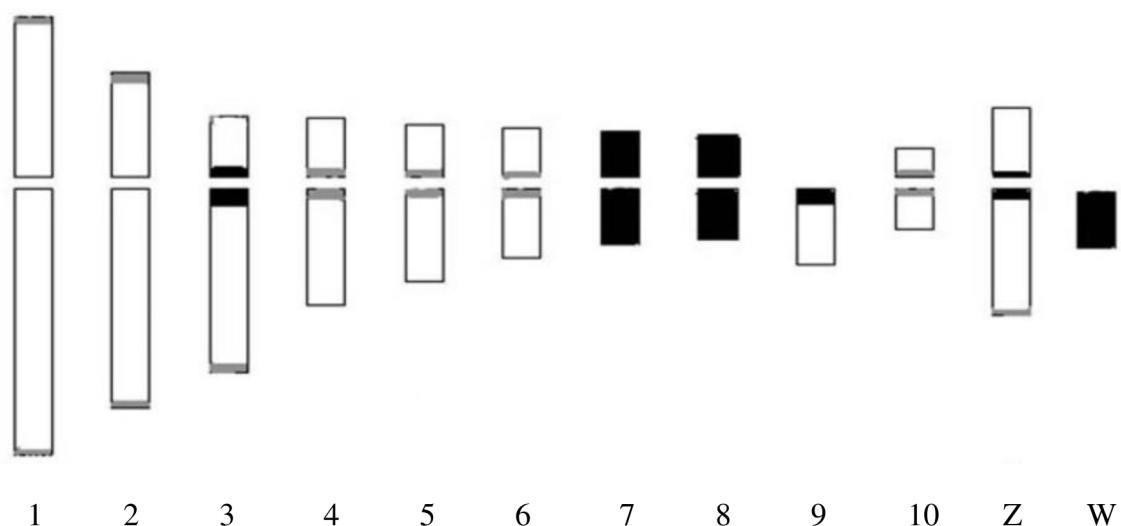
3.2.5 Karyotyp a charakterizace heterochromatinu

Čáp bílý má diploidní počet chromozomů $2n=68$. Sada chromozomů se skládá z 11 párů makrochromozomů (10 autozomálních párů a 1 pár gonozomů) zbývající páry jsou mikrochromozomy. Z 10 párů autozomálních makrochromozomů jsou páry č. 1, 2, 4 a 5 submetacentrické s celkovou délkou v rozmezí od $2,31 \pm 0,16 \mu\text{m}$ do $6,78 \pm 0,46 \mu\text{m}$. Páry č. 6, 7, 8 a 10 jsou metacentrické s celkovou délkou $1,11 \pm 0,14 \mu\text{m}$ do $1,86 \pm 0,18 \mu\text{m}$. Autozomový pár č. 3 je subtelocentrický s celkovou délkou $3,87 \pm 0,48 \mu\text{m}$, zatímco pár č. 9 je akrocentrický a jeho velikost je $1,21 \pm 0,16 \mu\text{m}$. Chromozom Z je velikostně čtvrtý a je submetacentrický, zatímco chromozom W je středně velký a akrocentrický (viz Obrázek č. 1) (Abu Shnaf *et al.* Khalifa, 2023).



Obrázek č. 1: Výběr makrochromozomů z karyotypu samce čápa bílého dle Abu Shnaf *et al.* Khalifa (2023). Samičí pár chromozomů ZW je přidán pro srovnání.

Konstitutivní heterochromatin je reprezentovaný výskytem variabilně velkých centromerických pruhů ve všech makrochromozomech kromě párů autozomů č. 1 a 2, které mají v telomerické oblasti slabý heterochromatin. Zatímco chromozomový pár č. 3 má kromě slabého telomerického C-pruhu také velký centromerický C-pruh, akrocentrický chromozomový pár č. 9 má velký blok C-pruhu. Zbývající autozomy mají různou velikost centromerického C-pruhu kromě autozomových párů č. 7 a 8, které vypadají zcela heterochromaticky, stejně jako pohlavní chromozom W. Pohlavní chromozom Z má kromě telomerické části středně velký centromerický C-pruh (viz Obrázek č. 2) (Abu Shnaf *et al.* Khalifa, 2023).



Obrázek č. 2: Idiogram makrochromozomů čápa bílého ilustrující pozici a velikost konstitutivního heterochromatinu podle Abu Shnaf *et Al-Khalifa* (2023). Šedou barvou jsou vyznačené oblasti s menším zastoupením heterochromatinu a černou barvou oblasti s větším zastoupením heterochromatinu. Bílou barvou jsou označené oblasti bez heterochromatinu.

3.2.6 Chování

Čáp bílý je někdy samotářský, ale v zásadě je to společenský druh. Čápi často hnízdí v samostatných, oddělených párech, ale v některých částech svého areálu tvoří volné kolonie o desítkách nebo dokonce stovkách párů. Na lokalitách se zdroji potravy se shromažďují velká hejna, a to v období rozmnožování (v Evropě), ale i v zimním období (v Africe). Jedinci jsou monogamní a hnízdo a jeho okolí si páry čápů zuřivě brání (Bocheński *et Jerzak*, 2006).

Typické chování a projevy definoval a popsal Kahl (1972). Nejznámějším chováním a zároveň nejčastějším způsobem vnitrodruhové komunikace čápa bílého je „Up-Down Display“ s klapáním zobáku. Provádí se téměř výhradně na hnízdě. Čáp se nejprve nakloní dopředu se zobákem směřujícím dolů, pak rychle natáhne krk nahoru a dozadu, a nakonec se dotkne svou hlavou hřbetu. Projev končí pomalým ohýbáním hlavy a krku do počátečního bodu, přičemž zobák je přidržován dole a klove do hnízda. Tuto sekvenci čápi několikrát opakují. Během tohoto projevu pták stojí (na jedné nebo obou nohách) nebo pomalu přechází z místa na místo. Čápi téměř vždy charakteristickým způsobem klapou svým zobákem. Klapání začíná, když krkem včetně hlavy máchne dozadu a pokračuje, dokud sekvenci nedokončí. V přítomnosti dravce nebo cizího čápa v blízkosti hnízda se provádí speciální úprava „Up-Down Display“ a to „Threat Up-Down

Display“ s máváním křídel, kterému předchází syčení. Poté, co čáp máchne hlavou směrem na záda, natáhne krk a zobák směrem k vetřelci a neustále klape zobákem a velmi silně natahuje ocas. Při tomto projevu čáp, zejména samec, částečně rozevře křídla a rytmicky jimi „pumpuje“ nahoru a dolů. Pokud je narušitel stále v blízkosti hnízda nebo se k němu přibližuje, může se tento projev změnit na jiný a to na „Forward Threat Display“. Zde čáp projevuje své agresivní chování tím, že drží tělo ve vodorovné linii, stahuje krk, orientuje zobák směrem k protivníkovi a přešlapuje z jedné nohy na druhou. Rovněž peří krku a horní části zad je vztyčené. Když se vetřelec pokusí přistát na hnízdě, může být provedeno „Nest Covering Display“. Čáp ohýbá nohy, otevírá a spouští křídla a zakrývá hnízdo. Může na něm také sedět nebo ležet s otevřenými křídly. Vetřelce často zažene bránící se pták (obvykle samec), který ho pronásleduje až několik stovek metrů od hnízda s klapáním zobáku. Když je čáp u hnízda vyrušen (např. člověkem nebo domácími zvířaty) nebo se blíží cizí čáp, ale je stále daleko, provede „Anxiety Stretch Display“. Pták stojí ve vzpřímené poloze, někdy vztyčuje peří na krku a naklání se k narušiteli. Občas vyděšený čáp klapne jednou zobákem. Zdá se, že v koloniích čápa bílého tento projev funguje jako varovný signál pro ostatní jedince. Když je nespářený nebo čerstvě spářený samec konfrontován se samicí blížící se k hnízdu, může provést „Head-Shaking Crouch Display“. Během tohoto projevu se pták přikrčí na hnízdě, zvedne křídla a ocas, vztyčí krční peří a peří zad a silně zavrtí hlavou.

3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou nazývány jako krátké tandemové repetice (STRs) anebo také jako jednoduché opakující se sekvence (SSRs), které jsou složené z tandemově opakujících se jednotek DNA o délce 1–6 bp (Abdul-Muneer, 2014; Bagshaw, 2017). Nacházejí se v jaderných genomech většiny eukaryot a v menší míře u prokaryot (Al-Samarai *et al.*, 2015). Vyskytují se v celém genomu. Jejich výskyt v genových oblastech je nižší, vzhledem k tomu, že mikrosatelity mají vysokou míru mutací, které by mohly ohrozit genovou expresi (Vieira *et al.*, 2016). Mikrosatelity lze hojně nalézt v nekódujících částech genomu, jako jsou introny, netranslatované oblasti (UTR) a intergenové prostory, ale vyskytují se také v kódujících sekvencích. Mikrosatelity se také nacházejí uvnitř transpozónů. Délky mikrosatelitních repetic v kódujících, nekódujících a intergenových oblastech jsou druhově specifické. Například obratlovci mívají větší počet mikrosatelitů ve srovnání s rostlinami a bezobratlými (Abdurakhmonov, 2016).

Mikrosatelity jsou oblíbené a univerzální genetické markery s nesčetnými aplikacemi v populační genetice, konzervační biologii a evoluční biologii. Mezi jejich výhody patří to, že jsou kodominantní, vysoce polymorfní, hypervariabilní, multialelické, mají vysoký informační obsah, jsou reprodukovatelné, převoditelné mezi příbuznými taxony, amplifikované z nízké koncentrované DNA horší kvality a dědí se mendelovským způsobem. Všechny tyto vlastnosti je činí velmi vhodnými pro studium populační struktury, analýzy rodokmenu, mapování genomu, evolučních procesů a pro DNA fingerprinting (Putman *et* Carbone, 2014). Také jsou užitečné pro analýzu rodičovství a pro odhad stupně příbuznosti jednotlivců nebo skupin (Al-Samarai *et* Al-Kazaz, 2015). Mezi nevýhody použití mikrosatelitů patří výskyt „stutter“ a „shadow“ bandů v gelu, přítomnost nulových alel, homoplazie a příliš mnoho alel na určitých lokusech, které by vyžadovaly velký počet jedinců pro analýzu. Další nevýhodou jsou relativně vysoké náklady na vývoj a technické problémy během konstrukce obohacených knihoven a druhově specifických markerů (Miah *et al.*, 2013). Vysoká variabilita, snadnost a přesnost stanovení mikrosatelitů z nich činí vhodný marker pro analýzu populace s vysokým rozlišením. Mikrosatelity s pouze několika alelami jsou vhodné pro populačně-genetické studie, zatímco variabilnější lokusy jsou ideální pro mapování genomu a analýzu rodokmenu. Méně polymorfní mikrosatelitní lokusy se používají k řešení taxonomických a fylogenetických vztahů různých taxonů (Abdul-Muneer, 2014).

Historicky byly tandemové repetice označovány jako nefunkční DNA, hlavně proto, že jsou vysoce nestabilní. Jejich biologická funkce souvisí s jejich pozicí v genomu (Vieira *et al.*, 2016). Mikrosatelity se mohou vyskytovat v oblastech kódujících a regulačních genů, proto jejich biologická funkce může být v takových procesech jako je genová exprese včetně transkripce a translace, umlčování genů, alternativní sestřih a transport mRNA, organizace chromatinu a regulace buněčného cyklu (Trivedi, 2004; Sjakste, 2013). Zapojení mikrosatelitů do těchto klíčových biologických procesů vede nejen ke změně fenotypu buňky a způsobuje onemocnění, ale také určuje evoluční osud, přežití, plasticitu a adaptaci organismů v měnících se podmínkách (Abdurakhmonov, 2016). Například v 5'-UTR oblasti slouží jako proteinová vazebná místa, čímž regulují translaci a funkci proteinů. Mikrosatelity umístěné v intronech mohou hrát roli v transportu, alternativním sestřihu mRNA, v umlčování genů, ale také v regulaci transkripce. Také ovlivňují úroveň exprese, pokud se nacházejí v promotorech nebo intergenových oblastech. V případě promotorů dochází ke zvýšení nebo snížení úrovně genové exprese způsobené změnami vazebných míst transkripčních faktorů, čímž může

dojít až k umlčení genu. V intergenových oblastech mohou způsobit změny v sekundární struktuře DNA, a to vytvářením smyček a změnou chromatinu, což nepřímo vede ke změnám v expresi blízkých genů (Vieira *et al.*, 2016).

Podle vzoru opakujících se motivů lze mikrosatelity klasifikovat jako dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené. Mikrosatelity mohou být také klasifikovány jako genomické, tj. navrhnuté z genomových DNA (gSSRs) nebo EST-SSR, odvozené z cDNA knihoven. Mikrosatelity mohou být u eukaryot klasifikovány jako jaderné (nuSSRs) a mitochondriální (mtSSRs), u rostlin navíc ještě jako chloroplastové (cpSSRs) (Al-Samarai *et Al-Kazaz*, 2015). S ohledem na počet nukleotidů na jednotku repetice lze mikrosatelity klasifikovat jako mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové repetice (Miah *et al.*, 2013).

Sklouznutí polymerázy během replikace je považováno za hlavní mechanismus vzniku mikrosatelitů a také polymorfismu. Ke vzniku mikrosatelitů může také dojít při opravě DNA spojené s transkripcí a/nebo při opravě dvouřetězcových zlomů, kde se k vyplnění mezer přednostně používají repetitivní sekvence. Mikrosatelitní mutace mohou současně změnit jednu nebo více opakujících se jednotek, což zvyšuje frekvenci mutací (Abdurakhmonov, 2016). Rychlost mutace se pohybuje v rozmezí 10^{-2} – 10^{-6} na generaci. Čím kratší je jednotka repetice a čím více jednotek repetice je v rámci lokusu, tím vyšší je frekvence mutací. Mutace, které se vyhnuly korekci systémem opravy chybného párování DNA, tvoří nové alely v lokusech mikrosatelitů. Z tohoto důvodu mohou na daném lokusu existovat různé alely a tím jsou mikrosatelity informativnější než jiné molekulární markery, včetně SNP (Vieira *et al.*, 2016). Pozice báze vzhledem k mikrosatelitu, umístění v genomu, typ a počet opakování, identita báze, přilehlá sekvence, rychlost rekombinace a transkripce výrazně ovlivňují míru mutací mikrosatelitů. Zejména mikrosatelity v nekódujících oblastech mají tendenci mutovat častěji než mikrosatelity v kódujících oblastech (Trivedi, 2004).

Návrh mikrosatelitních markerů lze rozdělit do následujících fází: (i) předchozí znalost nukleotidových sekvencí, ve kterých se mikrosatelity vyskytují, (ii) návrh primerů komplementárních k unikátním sekvencím obklopujícím z obou stran mikrosatelit; (iii) validace primerů pomocí PCR a elektroforézy produktů reakce a (iv) detekce polymorfismů v rámci i mezi jednotlivci (Mason, 2015). Při vyhledávání mikrosatelitů spočívá první krok v konstrukci obohacených genomových knihoven. Pro konstrukci genomových knihoven je DNA fragmentována, ligována do adaptorů a vložena do vektorů pro transformaci *Escherichia coli*. Většina protokolů zahrnuje fázi

obohacení o repetitivní sekvence pomocí selektivní hybridizace nebo PCR. Při obohacení pomocí hybridizace jsou pozitivní klony detekovány pomocí radioaktivně nebo chemicky značených SSR sond. Nakonec jsou tyto klony selektovány pomocí PCR amplifikace a sekvenování. Jiným způsobem obohacení knihovny je použití biotinizovaných sond, které jsou zachyceny kuličkami potaženými streptavidinem (Nunome *et al.*, 2006). Zachycená DNA je eluována, amplifikována, klonována a sekvenována. Obohacené knihovny se testují, aby se identifikovaly klony obsahující mikrosatelity. K nalezení mikrosatelitů však mohou být použity také neobohacené knihovny. Pokroky v sekvenování nové generace (NGS) poskytly novou možnost pro detekci mikrosatelitů. S příchodem NGS bylo nutné vytvořit databáze pro ukládání vygenerovaných informací. Kromě mikrosatelitů z genomových sekvencí byly získány z cDNA knihoven též EST mikrosatelity. Protože protokoly pro získání a izolaci *de novo* mikrosatelitních lokusů mohou být drahé, je zkoumání těchto prvků *in silico* slibnou strategií. Tento přístup je možný proto, že primery mikrosatelitních lokusů jsou často přenositelné mezi příbuznými druhy (Vieira *et al.*, 2016). Po identifikaci sekvencí obsahujících mikrosatelity musí být syntetizovány specifické primery, komplementární k přilehlým oblastem, následované amplifikací a testováním polymorfismu. Jakmile jsou vytvořeny primery mikrosatelitů, může začít genotypování. Jde o poměrně snadný a levný postup. Alelové varianty daného lokusu lze identifikovat elektroforézou v agarózovém nebo v polyakrylamidovém gelu, což jsou metody s nízkou složitostí běžně používané v laboratořích molekulární genetiky. Genotypizace pomocí PAGE je náročnější na práci, ale poskytuje lepší rozlišení (Mason, 2015). Fáze genotypizace spočívá ve srovnání elektroforetogramů různých jedinců (Vieira *et al.*, 2016).

3.3.1 Mikrosatelity u druhů z čeledi čápoovití

Pomocí *de novo* izolace bylo od tří druhů z čeledi čápoovití získáno a charakterizováno celkem 41 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Van Den Bussche *et al.*, 1999; Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003; Shephard *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Turjeman *et al.*, 2016). Konkrétně u čápa bílého (*Ciconia ciconia*) bylo doposud izolováno 18 polymorfních lokusů. U čápa východního (*Ciconia boyciana*) 8 a dále pak u nesyta amerického (*Mycteria americana*) 15 polymorfních mikrosatelitů.

3.3.2 Polymorfní mikrosatelity popsané *de novo* u čápoovitých

Nesyt americký je velký brodivý pták s dlouhýma nohama. Je rozšířen od jihovýchodu USA, přes Mexiko, Střední a Jižní Ameriku až po severní Argentinu. Van

Den Bussche *et al.* (1999) u tohoto druhu charakterizovali 4 mikrosatelitní lokusy (WS1, WS2, WS4 a WS6). DNA byla extrahovaná z krve 136 mláďat nesyta amerického pocházejících z 9 kolonií z Floridy a Georgie. Byla zkonstruována genomová knihovna o malé velikosti inzertů (200 až 400 bp). Fragmenty obsahující mikrosatelitní lokusy byly izolovány a sekvenovány. Primery byly navrženy tak, aby byly komplementární k unikátním sekvencím obklopujícím z obou stran mikrosatelit. Z tohoto počátečního screeningu knihovny bylo identifikováno a sekvenováno 10 mikrosatelitních lokusů. Pouze 4 z nich byly použity pro zkoumání variability v koloniích nesyta amerického. Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) navrhli 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů (W μ 03, W μ 08, W μ 09, W μ 13, W μ 14, W μ 17, W μ 18, W μ 19, W μ 20, W μ 23 a W μ 24). DNA byla extrahována z krve nesyta amerického. Extrahovaná DNA byla obohacena, štěpena enzymem *Hae*III a současně ligována do dvouřetězcových SuperSNX adaptorů. Ligovaná DNA byla denaturována, hybridizována na biotinylované oligonukleotidy a poté zachycena na streptavidinem potažených paramagnetických kuličkách. Nehybridizovaná DNA byla odmyta a zbývající DNA se eluovala z kuliček. DNA byla amplifikována pomocí PCR. Produkt byl ligován do vektoru a následně transformován do kompetentních *E. coli*. Bakteriální klony byly testovány na inzerty pomocí genu pro β -galaktosidázu. Téměř 400 bílých kolonií bylo amplifikováno. Nejméně 96 PCR produktů o velikosti 500–1000 bp bylo poté sekvenováno. Bylo navrženo 25 párů primerů. Dvacet čtyři párů primerů bylo optimalizováno pomocí vzorků DNA nesyta amerického získaných z populací z USA (Georgie a Florida) a Brazílie (Pantanal). Pouze 11 z 24 testovaných lokusů bylo polymorfních. Celkem 31 jedinců bylo genotypováno pro těchto 11 lokusů. Významné odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy byly detekovány v lokusech W μ 08, W μ 14 a W μ 20, které byly pravděpodobně způsobeny omezenou velikostí vzorku. Genotypová vazebná nerovnováha byla detekována pro jednu kombinaci lokusů (W μ 17 a W μ 18) ve floridské populaci a v brazilské populaci. Počet alel na lokus byl dvě až čtyři. Pozorovaná heterozygotnost byla od nuly do 0,727 a polymorfní informační obsah byl 0,048–0,604.

Shephard *et al.* (2009) navrhli sedm mikrosatelitních markerů u čápa bílého (Cc01–Cc07), které byly úspěšně zkombinovány v sérii multiplexních PCR se šesti markery (W μ 03, W μ 14, W μ 17, W μ 18, W μ 20 a W μ 23) dříve popsány u nesyta amerického (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003). DNA byla izolována z tkáně jednoho jedince. Genomová DNA byla štěpena pomocí enzymu *Mse*I a výsledné fragmenty byly ligovány do dvouřetězcových *Mse*I adaptorů. Produkty PCR byly

obohaceny o mikrosatelitní sekvence. Obohacená DNA byla amplifikována a následně produkty byly klonovány. Pozitivní kolonie byly odebrány a amplifikovány. Všechny PCR produkty byly purifikovány a sekvenovány. Analýza populace ($n = 30$) z Belgie odhalila 13 variabilních lokusů. Počet alel na lokus se pohyboval od dvou do deseti. Očekávaná heterozygotnost byla od 0,13 do 0,84. Lokus $WS_{\mu}03$ vykazoval odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Turjeman *et al.* (2016) navrhli 11 párů primerů u čápa bílého pomocí sekvenování nové generace. DNA byla extrahovaná z krve od dvou čápů, jeden pocházel z populace v severním Izraeli a druhý z populace v severovýchodním Německu. Šedesát čtyři mikrosatelitních lokusů bylo vybráno na základě délky jednotky repetice a počtu jejího opakování. Tyto markery byly testovány na polymorfismus pomocí PCR amplifikace u 94 vzorků čápů bílých. Z těchto lokusů bylo vybráno 11 (Cc10, Cc15, Cc18, Cc37, Cc42, Cc44, Cc50, Cc58, Cc61, Cc69 a Cc72). Po selekci markerů bylo genotypováno 213 jedinců, pocházejících ze severovýchodního Německa a východního Řecka. Počet alel na lokus se pohyboval od dvou do deseti. Pozorovaná a očekávaná heterozygotnost se pohybovala v rozmezí 0,118–0,784 a 0,136–0,827. Při seskupování vzorků z obou populací dohromady se lokusy Cc50 a Cc58 odchýlily od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, ale jednotlivě tuto odchylku vykazoval pouze vzorek ze severovýchodního Německa. Nebyl nalezen žádný důkaz o vazebné nerovnováze. Ve srovnání s původně publikovanými markery je tato sada polymorfnější, má větší heterozygotnost a tedy zvýšenou sílu v genetických studiích. Přidáním těchto markerů do sady molekulárních nástrojů čápa bílého by mohlo pomoci posoudit otázky týkající se jeho populační variability.

U čápa východního charakterizovali Wang *et al.* (2011) 8 mikrosatelitních lokusů (Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168 a Cbo235) a 3 *cross-species* mikrosatelity pocházející od nesyta amerického ($WS_{\mu}13$, $WS_{\mu}17$ a $WS_{\mu}18$). Čáp východní je ohrožený velký vodní pták, který je uveden v Červené knize IUCN a v příloze I úmluvy CITES. Mezi jeho hlavní oblast rozmnožování patří severní Čína a jihovýchodní Rusko. Jako zimoviště si vybírá mokřady středního a dolního toku řeky Jang-c'-ťiang. DNA byla získána ze vzorků tkáně nebo krve 23 jedinců čápa východního. Primery byly navrženy pomocí softwaru CID (Freitas *et al.*, 2008). Také bylo testováno devět mikrosatelitních markerů, které byly dříve popsány u nesyta amerického (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003). Nakonec bylo navrženo 14 mikrosatelitních markerů, z nich 8 bylo vybráno pro další analýzu. Lokus Cbo235 měl nulovou heterozygotnost, ale byl polymorfní se 2 alelami. Počet alel na lokus se pohyboval od dvou do osmi. Pozorovaná

heterozygotnost (H_0) se pohybovala od nuly do 0,857 a očekávaná heterozygotnost (H_E) se pohybovala od 0,222 do 0,851. Hodnota PIC se pohybovala od 0,205 do 0,812. U lokusů Cbo133 a Cbo235 se vyskytovaly nulové alely a také se odchylovaly od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Autoři neměli důkazy o existenci vazebné nerovnováhy mezi páry lokusů. Tyto markery byly použity při genetických studiích u čápa východního.

3.3.3 *Cross-species* mikrosatelity u druhů z čeledi čápovití

Cross-species testováním mikrosatelitů u druhů z čeledi čápovití se věnuje Laboratoř populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Hledáním a následnou charakteristikou mikrosatelitů u čápa bílého se včetně mě již zabývalo 5 studentek v 7 pracích (Obručová, 2009; Burianová, 2011; Fišerová, 2014; Gajdošíková, 2020; Krňávková, 2021; Macková, osobní sdělení; tato práce).

Burianová (2011) ve své diplomové práci hledala polymorfnní mikrosatelitní lokusy, které by mohly být využity pro determinaci paternity u čápa bílého. Celkově testovala 198 párů prumerů pocházejících od zástupců z řádů: brodiví, dlouhokřídli, plameňáci, potáplice a veslonozí. Nalezla 13 polymorfnních mikrosatelitních lokusů. Ve své práci navázala na svou bakalářskou práci (Obručová, 2009), kde testovala 168 párů prumerů u 6 jedinců čápa bílého a našla 18 polymorfnních mikrosatelitů. Celkově tedy u čápa bílého našla 31 polymorfnních lokusů s počtem alel od 2 do 10. Všechny polymorfnní mikrosatelity následně genotypovala a analyzovala na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého pomocí programu Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007). Díky programu Genepop 4.0.10 (Rousset, 2008) zjistila silnou vazbu na Z chromozom mezi třemi mikrosatelitními lokusy a čtyři lokusy byly vázány na pohlaví. Dále na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého zkoumala polymorfismus 13 mikrosatelitních lokusů popsanych přímo u čápa bílého. Zjistila 8 polymorfnních mikrosatelitních lokusů s počtem alel od 2 do 23. Tyto mikrosatelity opět charakterizovala pomocí programů Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.0.10 (Rousset, 2008).

Fišerová (2014) se ve své diplomové práci zabývala analýzou a charakteristikou polymorfnních *cross-species* mikrosatelitů u čápa bílého (*C. ciconia*) (6 jedinců), černého (*C. nigra*) (6 jedinců) a simbila (*C. abdimii*) (6 jedinců). U čápa bílého a černého testovala 31 párů prumerů od zástupců z řádů brodiví (čáp východní, volavka rusohlavá) a potápky (potápka západní). U čápa simbila testovala 22 párů prumerů, které byly původně navrženy pro volavku rusohlavou a potápku západní. Polymorfnní produkt našla pouze

u čápa bílého, konkrétně u mikrosatelitů Cbo108, Cbo109, Cbo151, Cbo168 a B112b. Počet alel byl 2–4. U čápa černého a simbila nebyly nalezeny žádné polymorfnní produkty. Ve druhé části své diplomové práce provedla genotypizaci na 10 jedincích čápa simbila, pomocí 50 párů primerů. Páry primerů pocházely od zástupců z řádu brodiví, dlouhokřídli a veslonoží. Čtyři páry byly vyřazeny, protože neposkytovaly hodnotitelné produkty a zbývajících 46 charakterizovala pomocí genetického programu Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007).

Gajdošíková (2020) ve své bakalářské práci testovala polymorfismus mikrosatelitních lokusů u čápa bílého. Pro *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů na genomické DNA 6 jedinců čápa bílého použila celkem 173 párů primerů, z nichž 113 bylo navrženo pro amplifikaci mikrosatelitních lokusů u zástupců z řádu tučňáci, 36 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů navrženo pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Celkově detekovala 19 polymorfnních lokusů s počtem alel od 2 do 3. Na výsledky této bakalářské práce navázala aktuálně svou diplomovou prací Macková. Ve své práci retestovala výsledky výše zmíněné práce na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého a potvrdila polymorfismus u 15 mikrosatelitních lokusů. Počet alel byl od 2 do 4 (osobní sdělení).

Ve své bakalářské práci (Krňávková, 2021) jsem u čápa bílého hledala polymorfnní mikrosatelitní lokusy prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace s použitím 213 párů primerů, kdy 207 pocházelo od zástupců z řádu trubkonosí, 5 od zástupců z řádu dlouhokřídli a 1 z řádu pěvci. Testováním těchto párů primerů na DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého jsem našla 18 polymorfnních mikrosatelitů. Počet alel se pohyboval od dvou do šesti. Jeden mikrosatelitní lokus neposkytl žádný produkt. Aktuálně v rámci diplomové práce pokračuji v analýze a charakterizaci vybraných polymorfnních mikrosatelitů z řádu trubkonosí na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého (viz kapitola Výsledky).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V rámci praktické části mé diplomové práce byla pro *cross-species* testování vybraných polymorfních mikrosatelitních lokusů použita DNA od 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Krev pocházela od nepříbuzných mláďat odchycených z různých hnízd v rámci České republiky, vždy od jednoho mláděte z jednoho hnízda. Z odebraných vzorků krve byla vedoucím mé diplomové práce vyizolovaná genomická DNA, s použitím fenol-chloroformové metody a následně byla DNA rozpuštěna v TE pufru. Poté byla pomocí spektrofotometru NanoDrop změřena její koncentrace a byla naředěna tak, aby se pohybovala v rozmezí 5–50 µg/ml.

4.2 Polymorfní mikrosatelitní lokusy u čápa bílého

Pro analýzu a charakteristiku vybraných polymorfních mikrosatelitních lokusů byly použity páry primerů, které byly určeny jako polymorfní v mé bakalářské práci (Krňávková, 2021) pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace na DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého. Páry primerů pocházely od druhů z řádu trubkonosí, konkrétně jeden mikrosatelitní lokus pocházel z čeledi albatrosovití, čtyři z čeledi buňňákovití a třináct z čeledi buňňákovití. Všechny polymorfní mikrosatelity jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Seznam 18 mikrosatelitních lokusů odvozených od druhů z řádu trubkonosí, které byly označeny jako polymorfní u čápa bílého v mé bakalářské práci (Krňávková, 2021).

Mikrosatelit	Zdrojový druh	Literární zdroj
De7	Albatros stěhovavý (<i>Diomedea exulans</i>)	Burg, 1999
Paequ10	Buňňák bělobradý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	Techow <i>et</i> O’Ryan, 2004
Parm02	Buňňák trinidadský	Brown <i>et</i> Jordan, 2009
Parm05	(<i>Pterodroma arminjoniana</i>)	
Ptero02	Buňňák havajský	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011
Ptero04	(<i>P. sandwichensis</i>)	
Ptero09		
Puff G2C	Buňňák baleárský	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
Puff G2F	(<i>Puffinus mauretanicus</i>)	
Pc A107	Buňňák světloňový	Hardesty <i>et al.</i> , 2013
Pc D103	(<i>P. carneipes</i>)	

Tabulka č. 1: Pokračování.

Mikrosatelit	Zdrojový druh	Literární zdroj
Bb22	Buňňák Bulwerův	Andris <i>et al.</i> , 2010
Bb23	(<i>Bulweria bulwerii</i>)	
Pacbel_07265	Buňňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	Moodley <i>et al.</i> , 2015
Oc28B	Buňňáček madeirský	Sun <i>et al.</i> , 2009
Oc87B	(<i>Oceanodroma castro</i>)	
Omn8	Buňňáček Monteirův	Bried <i>et al.</i> , 2012
Omn23	(<i>O. monteiroi</i>)	

4.3 PCR amplifikace genomické DNA čápa bílého

PCR amplifikace byla provedena na genomické DNA 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého pomocí 18 párů primerů. Postup přípravy vzorků pro amplifikaci byl následující:

1. Složky PCR reakční směsi byly nejprve rozmrazeny, poté zvortexovány a zcentrifugovány.
2. Následně do 1,5ml mikrozkušavek byly napipetovány všechny složky PCR směsi dle tabulky č. 2 a poté byla směs opět zvortexována a zcentrifugována.

Tabulka č. 2: Složení PCR reakční směsi pro 23 vzorků.

Složky reakční směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Objem složek [μl]
Deionizovaná voda	-	157,0
Reakční pufr	10x	24,0
Roztok MgCl ₂	25 mmol/l	14,3
Roztok dNTPs	20 mmol/l	2,5
Primer R	10 μmol/l	11,9
Primer F	10 μmol/l	11,9
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	5 U/μl	6,0

3. Do 23 PCR mikrozkušavek o objemu 0,2 ml bylo napipetováno pomocí osmikanálové pipety po 1 μl genomické DNA od 23 různých jedinců čápa bílého.
4. Ke genomické DNA bylo připipetováno 9 μl PCR reakční směsi.
5. Poté byly mikrozkušavky vloženy do termocykleru s nastavenými teplotními a časovými podmínkami (viz Tabulka č. 3).

Tabulka č. 3: Teplotní a časový profil PCR reakce.

Krok PCR	Teplota [°C]	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	30 s	
Annealing	*	30 s	35
Elongace	72	30 s	
Finální elongace	72	7 min	1

* pro jednotlivé páry primerů byly použity teploty *annealingu*, které byly optimalizovány v mé bakalářské práci (Krňávková, 2021), dle potřeby byly dále upravovány (viz kapitola Výsledky).

4.4 Elektroforetická separace PCR produktů

Separace byla provedena za denaturujících podmínek s použitím 6% polyakrylamidového gelu, který byl nalit mezi dvě skla o rozměrech 330 x 390 mm a 330 x 420 mm. Tloušťka gelu byla 0,4 mm. Separace probíhala ve vyhřívané elektroforetické komůrce S2 (Whatman Biometra). Celý postup probíhal následovně:

Ošetření skel

1. Plochy obou skel, které se dotýkaly gelu, byly 2x opláchnuty deionizovanou vodou a následně vysušeny papírovou utěrkou, poté byly 2x opláchnuty 96% ethanolem a opět vysušeny.
2. Pomocí přípravku pro odpuzování vody (Rain-off) byla ošetřena plocha velkého skla. Přípravek byl rozetřen po celé ploše pomocí papírového ubrousku. Po zaschnutí (5 min) bylo sklo opět 2x opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno papírovou utěrkou.
3. V digestoři byla plocha malého skla ošetřena 1 ml roztoku 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu, který byl rozetřen po celé ploše skla pomocí papírového ubrousku. Po zaschnutí (5 min) bylo sklo 4x opláchnuto 96% ethanolem a znovu vysušeno.
4. Na polystyrenovou podložku umístěnou v digestoři bylo ošetřenou plochou nahoru položeno velké sklo a na jeho delší okraje byly umístěny dva 0,4mm spacers. Poté bylo na velké sklo položeno malé sklo ošetřenou plochou dolů a spacers byly srovnány až do okrajů skel. Následně byl gel v místě spacerů sepnut dvěma klipsy.

Příprava 6% roztoku polyakrylamidového gelu

1. Pomocí válce bylo odměřeno 60 ml pracovního roztoku akrylamidu : N, N'-metylenbisakrylamidu, který byl následně nalit do kádinky. Mikropipetou bylo přidáno 40 μ l N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu a 400 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného.
2. Hotový gel byl postupně naléván mezi skla. Aby nedošlo ke vzniku vzduchových bublin bylo na sklo při lítí gelu lehce poklepáváno rukou.
3. Po nalití gelu byl mezi skla vložen hřebínek (asi 5 mm hluboko) a v místě hřebínku byla skla sepnuta čtyřmi klipsy. Gel byl nechán hodinu tuhnout.

Elektroforetická separace

1. Po ztuhnutí gelu byly všechny klipsy sundány a skla byla důkladně umyta vodou za pomoci kartáčku. Byly odstraněny všechny zbytky gelu, a to především v oblasti hřebínku. Menší sklo bylo osušeno pomocí papírového ubrousku.
2. Skla byla upevněna do elektroforetické komůrky hřebínkem nahoru a tak, aby malé sklo směřovalo k hliníkové desce komůrky. Do katodového a anodového prostoru byl nalit 0,5x TBE pufr.
3. Hřebínek byl opatrně vytáhnout a prostor, kde se nacházel hřebínek, byl vyčištěn za pomoci stříkačky a pufru. Oba prostory byly uzavřeny, byly připojeny elektrody ke zdroji elektrického proudu a gel byl nechán nahřívát po dobu 30 min při nastavení zdroje: napětí 3000 V, proud 150 mA a výkon 90 W.
4. Během nahřívání gelu byly připraveny vzorky, kdy ke každému PCR produktu bylo přidáno 5 μ l nanášecího pufru a poté byly vloženy do termocykleru a po dobu 3 minut byly denaturovány. Po denuraci byly vzorky umístěny do ledové tříště.
5. Po nahřátí gelu byl vypnut zdroj elektrického proudu, odpojena katoda a prostor mezi skly byl znovu vyčištěn pomocí stříkačky. Poté byl vsunut hřebínek asi 1 mm hluboko do gelu a pomocí osmikanálové pipety byly nanášeny 2 μ l připravených vzorků.
6. Poté byl katodový prostor znovu uzavřen, byla připojena elektroda a na zdroji elektrického proudu byla nastavena hodnota výkonu na 70 W a vzorky byly separovány po dobu 1,5–3 hod.
7. Mezitím byly připraveny roztoky k vizualizaci gelu a to fix/stop roztok, 1% roztok HNO₃, 0,1% roztok AgNO₃ a vývojka. Vývojka byla po protřepání vložena do chladničky.

8. Elektroforetická separace byla ukončena vypnutím zdroje stejnosměrného elektrického proudu, elektrody byly odpojeny a byl vypuštěn pufr. Skla byla vyjmuta, položena na fotomisku malým sklem nahoru, byly vytáhnuty spacery a hřebínek, pomocí nože byla skla od sebe oddělena.

Vizualizace gelu

1. Malé sklo s gelem bylo vloženo do fotomisky gelem nahoru, přeneseno na třepačku do digestoře a do misky byl nalit fix/stop roztok, sklo s gelem v něm bylo ponecháno po dobu 20 min. Fix/stop roztok byl poté slit zpět do baňky a sklo bylo 3x promyto deionizovanou vodou.
2. Následně byl do misky nalit roztok 1% HNO₃ a byl nechán působit po dobu 4 min. Roztok HNO₃ byl vylit do odpadu, sklo bylo 4x opláchnuto deionizovanou vodou.
3. Mezitím bylo do roztoku 0,1% AgNO₃ přidáno 1,2 ml formaldehydu. Sklo bylo přemístěno do další fotomisky a bylo zalito připraveným roztokem 0,1% AgNO₃, sklo s gelem v něm bylo ponecháno po dobu 30 min.
4. Během působení roztoku 0,1% AgNO₃ byla připravena další fotomiska s deionizovanou vodou a do baňky s vývojkou bylo přidáno 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného.
5. Po uplynutí doby působení byl roztok 0,1% AgNO₃ slit zpět do baňky a sklo bylo umístěno na 5 sekund do připravené vody. Následně bylo sklo přemístěno do další fotomisky a gel byl zalit vývojkou.
6. V gelu se postupně začaly vyvíjet hnědočerné pruhy produktů PCR. Až byly pruhy dostatečně zřetelné, gel byl zalit fix/stop roztokem, tím došlo k zastavení vyvíjení.
7. Sklo bylo přemístěno do fotomisky s deionizovanou vodou, necháno okapat a poté bylo přeneseno do sušárny na dobu přibližně 30 min při 90 °C.
8. Usušený gel byl vyhodnocen na negatoskopu a poté naskenován do počítače.
9. Sklo s vyhodnoceným gelem bylo následně ponořeno do 1 mol/dm³ roztoku NaOH, následně omyto saponátem a deionizovanou vodou.

4.5 Statistické vyhodnocení výsledků

Získané genotypy byly u 23 jedinců čapa bílého zpracovány pomocí dvou populačně-genetických programů a to: Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008).

Pomocí programu Cervus 3.0.7 byly u čápa bílého stanoveny hodnoty očekávané (H_E) a pozorované (H_O) heterozygotnosti, polymorfni informační obsah (PIC) a frekvence výskytu nulových alel. Dále pak to, zda jsou lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze a zjištění spolehlivosti při detekování paternity. Program Genepop 4.7.5 byl použit pro analýzu vazby mezi všemi dvojicemi lokusů.

4.6 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5 U/ μ l, M1241 (Promega))
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTPs) (100 mmol/l, 400 μ l každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid draselný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachner)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED) (AppliChem)
- N, N' - methylenbisakrylamid (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Tekuté stěračé Rain Off (Sheron)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)

- Triton X-100 (Amresco)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.7 Použité roztoky a jejich příprava

Fix/stop roztok:

- 88 ml ledové kyseliny octové
- 800 ml deionizované vody

Nanášecí pufr:

- 25 ml deionizované vody
- 100 ml formamidu
- 0,125 g bromfenolové modře
- 0,125 g xylenové modře

Reakční pufr pro PCR (10x):

- 1,211 g trishydroxymethylaminometanu
- 3,73 g KCl
- 80 ml deionizované vody
- 1 ml Triton X-100
- Upravit pH pomocí HCl na hodnotu 9,0 a poté doplnit do 100 ml

Roztok dusičnanu stříbrného (0,1%):

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

Roztok hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/dm³:

- 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 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Roztok peroxidisíranu amonného (10%):

- 1 g peroxidisíranu amonného

- 10 ml deionizované vody
- Roztok uchovávat v chladničce

Roztok polyakrylamidové gelu (6%):

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

Vývojka:

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

Zásobní roztok akrylamidu (6 %):

- 420 g močoviny
- 50 ml 10x TBE
- 484 ml deionizované vody
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N, N' - methylenbisakrylamid (v poměru 19:1)
- Všechny složky rozpustit, poté zfiltrovat a uchovat tmavé láhvi v chladničce

Zásobní roztok TBE pufru (10x):

- 55 g kyseliny borité
- 108 g trishydroxymethylaminomethanu
- 40 ml 0,5 mol/dm³ roztoku ethylendiaminotetraoctanu sodného, pH 8,0
- Deionizovanou vodou doplnit do 1 l

4.8 Použité laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette - 0,5 až 10 μ l (osmikanálová) (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Finnpiette - 0,3 μ l až 1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 μ l až 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 TP XP (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Ice Flaker (Brema Ice Makers)

5 Výsledky

V rámci experimentální části mé diplomové práce jsem se zabývala analýzou a charakterizací vybraných *cross-species* mikrosatelitních lokusů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), které jsem v rámci své bakalářské práce (Krňávková, 2021) u tohoto druhu označila jako polymorfní. V bakalářské práci jsem testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace 213 párů primerů na DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého, kdy 207 párů primerů pocházelo od zástupců z řádu trubkonosí. Dalších 6 párů, které byly u trubkonosých použity jako *cross-species* a poskytly u nich polymorfní produkt, z nich 5 párů primerů pocházelo od tří druhů z řádu dlouhokřídlí a 1 z řádu pěvců. Celkově jsem v bakalářské práci detekovala 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Konkrétně 1 mikrosatelitní lokus pocházel od jednoho druhu z čeledi albatrosovití, 4 od dvou druhů z čeledi buřňáčkovití a 13 od sedmi druhů z čeledi buřňákovití.

V této diplomové práci jsem na DNA 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého charakterizovala 18 polymorfních mikrosatelitů amplifikovaných výše zmíněnými páry primerů. Jako počáteční teploty *annealingu* (T_a) jsem použila ty, které jsem označila jako finální ve své bakalářské práci (Krňávková, 2021). U většiny mikrosatelitních lokusů jsem musela upravit teploty *annealingu* uvedené v bakalářské práci. V případě žádného nebo málo zřetelného PCR produktu jsem snížila jeho T_a o 3–5 °C. V opačném případě, tedy pokud byl produkt velmi silný a špatně hodnotitelný, jsem T_a zvýšila. Finální teplota *annealingu* se pohybovala v rozmezí od 51 do 66 °C. Následně jsem PCR produkty separovala pomocí elektroforézy, jejíž trvání jsem upravovala tak, aby jednotlivé alely lokusu byly od sebe snadno odlišitelné. PCR produkty jednotlivých mikrosatelitů jsem separovala v rozmezí od 90 do 180 minut. Dále jsem u problematicky hodnotitelných mikrosatelitů snižovala koncentraci hořčnatých iontů v PCR reakční směsi, a to konkrétně u dvou mikrosatelitních lokusů: u mikrosatelitu Pacbel_07265 jsem snížila koncentraci (objem) hořčnatých iontů z koncentrace 25 mmol/l (14,3 μ l) na $3/4$ (18,75 mmol/l (10,7 μ l)), u mikrosatelitu Puff G2F z koncentrace 25 mmol/l (14,3 μ l) na $2/3$ (16,67 mmol/l (9,5 μ l)). O chybějící objem byla poté doplněna deionizovaná voda, aby nedošlo ke změně finálního objemu PCR reakční směsi.

Celkově jsem amplifikací 18 párů primerů získala 17 polymorfních lokusů (viz Tabulka č. 4). Mikrosatelit Oc87B jsem v mé bakalářské práci (Krňávková, 2021) označila jako polymorfní se dvěma alelami, ale na elektroforetogramu 23 jedinců v této diplomové práci bylo jasné, že variabilita, která na malém počtu jedinců vypadala jako

mikrosatelitní, není mikrosatelitového charakteru a mikrosatelit byl proto z dalších analýz vyřazen. Na základě zjištěných alelových konstitucí všech polymorfních mikrosatelitů u 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého jsem tyto lokusy analyzovala a charakterizovala prostřednictvím populačně-genetických programů Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008). Těmito programy jsem získala informace o Hardy-Weinbergově rovnováze a frekvenci výskytu nulových alel (viz Tabulka č. 4). Dále pak hodnoty pozorované (H_O) a očekávané (H_E) heterozygotnosti (viz Tabulka č. 5). A také informace o případné vazbě mezi dvěma lokusy.

Tabulka č. 4: Charakteristika 17 polymorfních mikrosatelitů, které byly genotypovány u 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého. V tabulce je uveden název lokusu s kódem uvedeným v databázi GenBank, dále zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel (N), délka elektroforetické separace (ELFO), teplota *annealingu* (T_a), odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW) a frekvence výskytu nulových alel (F).

Lokus (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	N	ELFO [min]	T_a [°C]	HW	F [%]
De7 (AF096792)	Albatros stěhovavý	F: GAGGAAACTCCATCTGCCA R: TCTGAACCTCTATCAAAAGG	AC	2	90	59	ND	-
Paequ10 (neuveдено)	Buňňák bělobradý	F: GAAGCTGCACTGGAAGT R: CATGTGGTAAGAATCCAGATG	CA	2	160	63	NS	-
Parm02 (EU360818)	Buňňák trinidatský	F: AGCAAGCTGACAGCAACAGA R: TGTTATGTCCTGCGGATGAG	CA	3	120	65	NS	0,10
Parm05 (EU360821)		F: CGTATACCCTGCAGATACGC R: CTCAGTGCCAATTCGTACCC	CA	2	90	57	ND	-
Ptero02 (HQ918219)	Buňňák havajský	F: AAGCGCTTCACTGGAGGA R: TGACCTGTGTGCCTTCATTC	CA	4	120	55	NS	-
Ptero04 (HQ918221)		F: TGCATTGTTTCTGTCCAAACTC R: GGCTGGAATGCATAGTACCAAC	CA	3	120	66	NS	-
Ptero09 (HQ918226)		F: GCAAATACCAGTCTTCCAAAGG R: TTTAAGATAAAGATGTTTGAGAACCAC	AAGG	4	120	61	NS	-
Puff G2C (EU158898)	Buňňák baleárský	F: CTGAAATCAGACATTATTTTC R: ACAATATGCAAACCTTTTGTG	GT	4	120	52	NS	11,28
Puff G2F^Δ (EU158899)		F: GCTCTCCCAGTTTGCACG R: TCCCATGCTTTAACCCTG	GT	2	180	60	ND	13,21

Legenda: ^Δ - dvoutřetinová koncentrace (16,67 mmol/l) hořčnatých iontů v PCR mixu; ND - lokus nelze vyhodnotit, zda je v souladu s HW rovnováhou; NS - lokus je v souladu s HW rovnováhou

Tabulka č. 4: Pokračování.

Lokus (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	N	ELFO [min]	T _a [°C]	HW	F [%]
Pc A107 (JX435472)	Buřňák	F: AAAGCCAGTAGGTGTATTCAAC R: AAGTGGGAGGAAAGAGTGTAG	GT	2	180	56	NS	-
Pc D103 (JX435479)	světlonohý	F: GGAAAGATGTCATGCTGATGA R: GTGGGAGATTCATAGGCAAAG	GATA/GATG	4	90	51	NS	-
Bb22 (HM171898)	Buřňák	F: TTCACAGCAGAATCACCTCAG R: GCTCAAAGGGTGGAAATTGTT	TG	2	90	60	ND	-
Bb23 (HM171899)	Bulwerův	F: TCAAAAGCTCACTCCCCTTT R: ATCTTCCCTTGCCTTCCTTT	CA	2	90	51	ND	-
Pacbel_07265* (neuveдено)	Buřňák útlozobý	F: CGTCACTTTAATAGCGCTGGC R: ACCCTGATTTTCCCAGTCCG	GT	5	90	52	NS	-
Oc28B (FJ238097)	Buřňáček madeirský	F: GCGTTGACCAGCAAATAGTC R: GGAAGGCTACCACAATTTCA	TG	2	90	52	NS	6,88
Omn8 (JQ303232)	Buřňáček	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTTAA	AC	6	90	59	NS	2,67
Omn23 (JQ303240)	Monteirův	F: GGAAAAGGAGACTAGATCTTGTGAA R: AAACCTACTTTGTTATTTCCATATGTTT	TTG	2	90	61	ND	43,95

Legenda: * - tříčtvrteční koncentrace (18,75 mmol/l) hořčnatých iontů v PCR mixu; ND - lokus nelze vyhodnotit, zda je v souladu s HW rovnováhou;

NS - lokus je v souladu s HW rovnováhou

Amplifikací 18 párů primerů u 23 jedinců čápa bílého jsem našla 17 polymorfních mikrosatelitních lokusů s počtem alel od 2 do 6. Nejvíce alel (tedy 6) měl mikrosatelit Omn8 pocházející od buřňáčka Monteirova. Nejméně alel (2) měly mikrosatelity: De7 (albatros stěhovavý), Paequ10 (buřňák bělobradý), Parm05 (buřňák trinidadský), Puff G2F (buřňák baleárský), Pc A107 (buřňák světlonohý), Bb22 a Bb23 (buřňák Bulwerův), Oc28B (buřňáček madeirský) a Omn23 (buřňáček Monteirův). Celkově jsem u devíti lokusů našla po 2 alelách, u dvou lokusů po 3 alelách, u čtyř lokusů po 4 alelách, u jednoho 5 alel a u jednoho 6 alel. U všech mikrosatelitů jsem určila počet alel, genotypů a pozorovanou (H_O) a očekávanou (H_E) heterozygotnost (viz Tabulka č. 5). Největší počet genotypů byl 9 a to u pětialelového mikrosatelitu Pacbel_07265 a šestialelového mikrosatelitu Omn8.

Tabulka č. 5: Polymorfní mikrosatelitní lokusy testované na DNA 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého. V tabulce je uveden název mikrosatelitu, zdrojový druh, počet alel, počet genotypů, pozorovaná heterozygotnost (H_O) a očekávaná heterozygotnost (H_E).

Mikrosatelit	Zdrojový druh	Počet alel	Počet genotypů	H_O	H_E
De7	Albatros stěhovavý	2	2	0,174	0,162
Paequ10	Buřňák bělobradý	2	3	0,435	0,394
Parm02	Buřňák	3	6	0,652	0,666
Parm05	trinidadský	2	2	0,261	0,232
Ptero02	Buřňák	4	7	0,696	0,666
Ptero04	havajský	3	5	0,652	0,587
Ptero09		4	7	0,783	0,693
Puff G2C	Buřňák	4	8	0,522	0,650
Puff G2F	baleárský	2	3	0,174	0,232
Pc A107	Buřňák	2	3	0,565	0,496
Pc D103	světlonohý	4	7	0,696	0,679
Bb22	Buřňák	2	2	0,217	0,198
Bb23	Bulwerův	2	2	0,087	0,085
Pacbel_07265	Buřňák útlozobý	5	9	0,913	0,739
Oc28B	Buřňáček madeirský	2	3	0,435	0,510
Omn8	Buřňáček	6	9	0,739	0,785
Omn23	Monteirův	2	3	0,043	0,125

Pomocí programu Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) jsem charakterizovala všech 17 polymorfních mikrosatelitních lokusů. V průměru byly na jeden lokus nalezeny 3 alely a průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,4646. Průměrný polymorfní

informační obsah (PIC) měl hodnotu 0,4020. Také byla vypočtena pravděpodobnost chybného přiřazení prvního rodiče k mláděti v případě, že není znám ani jeden z rodičů, ta měla hodnotu $6,43 \cdot 10^{-2}$, pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče k mláděti v případě, že je znám první z rodičů, byla $5,0 \cdot 10^{-3}$ a pravděpodobnost chybného přiřazení rodičovského páru k mláděti, byla $1,54 \cdot 10^{-4}$. Pravděpodobnost, že budou mít dva náhodně vybraní nepříbuzní jedinci stejnou alelovou konstituci všech polymorfních lokusů, byla $4,62 \cdot 10^{-9}$ a pravděpodobnost, že dvě náhodně zvolená příbuzná mláďata budou mít stejnou alelovou konstituci na všech lokusech, byla $1,64 \cdot 10^{-4}$. Všechny tyto vlastnosti jsou detailně popsány v příloze č. 1.

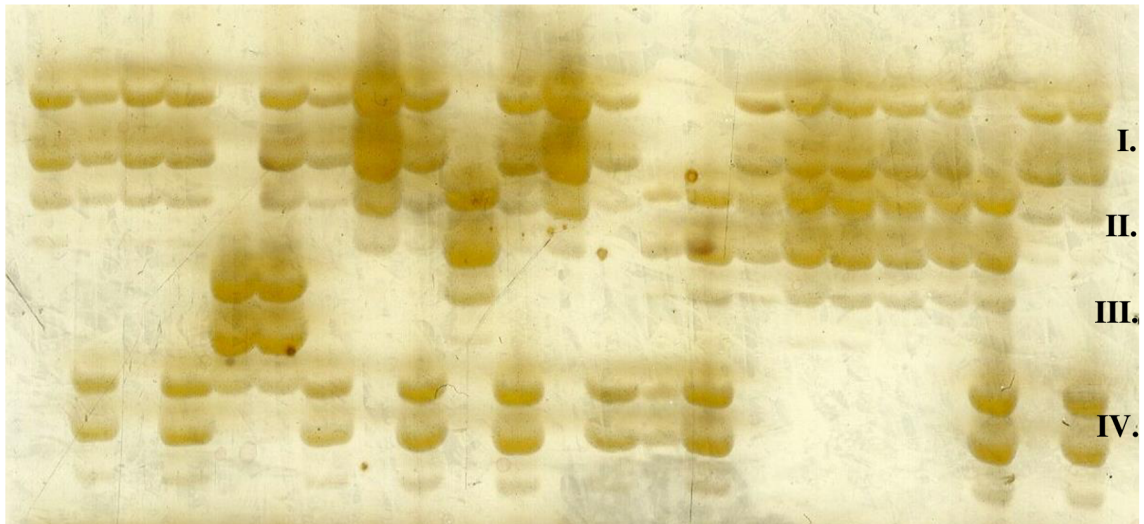
Program Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) jsem použila pro detekci možné vazby. Všechny mikrosatelity byly testovány v párech a žádná dvojice se nenacházela ve vazbě a všechny jsou navzájem nezávislými markery.

Jedenáct ze sedmnácti testovaných polymorfních lokusů se nacházelo v Hardy-Weinbergově rovnováze, tyto mikrosatelity jsou v tabulce č. 4 označené zkratkou NS. U zbývajících šesti lokusů (dvoualelových) nebyl program Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) schopný určit, zda jsou v Hardy-Weinbergově rovnováze, v tabulce č. 4 jsou označené zkratkou ND. U 11 lokusů nebyl zaznamenán výskyt nulových alel. Největší frekvence výskytu nulových alel byla u lokusu Omn23 a to 43,95 %. Lokusy Puff G2C a Puff G2F měly frekvenci výskytu nulových alel v rozmezí 10–20 %, lokus Oc28B v rozmezí 5–10 % a lokusy Parm02 a Omn8 méně než 5 %.

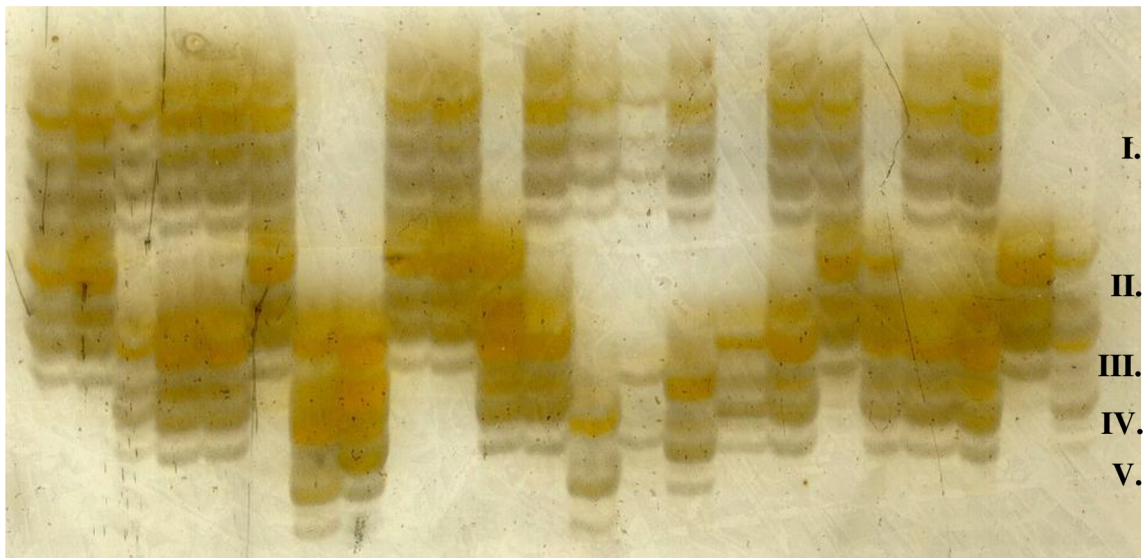
Roli u mikrosatelitů mají nejenom výpočtem získané vlastnosti, ale také to, jak je mikrosatelit hodnotitelný. Hodnotí se, jak jsou jednotlivé alely zřetelné, zda se nevyskytují nějaké přídavné produkty, které by znemožňovaly hodnocení. Mezi špatně hodnotitelný mikrosatelit patřil Puff G2F. Naopak dobře hodnotitelné mikrosatelity byly Oc28B (Obrázek č. 3), Ptero02 (Obrázek č. 4) a Pacbel_07265 (Obrázek č. 5).



Obrázek č. 3: Elektroforetogram dvoualelového lokusu Oc28B u 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého. Amplifikace probíhala při teplotě *annealingu* 52 °C a následná elektroforetická separace probíhala po dobu 90 minut. Římskými číslicemi jsou vyznačeny jednotlivé alely (I.–II.).



Obrázek č. 4: Elektroforetogram čtyřalelového lokusu Ptero02 u 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého. Amplifikace probíhala při teplotě *annealingu* 55 °C a následná elektroforetická separace probíhala po dobu 120 minut. Římskými číslicemi jsou vyznačeny jednotlivé alely (I.–IV.).



Obrázek č. 5: Elektroforetogram pětialelového lokusu Pacbel_07265 u 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého. Amplifikace probíhala při teplotě *annealingu* 52 °C a následná elektroforetická separace probíhala po dobu 90 minut. Římskými číslicemi jsou vyznačeny jednotlivé alely (I.–V.).

6 Diskuse

V rámci experimentální části mé diplomové práce jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace analyzovala a charakterizovala 18 mikrosatelitních lokusů, které jsem ve své bakalářské práci (Krňávková, 2021) označila jako polymorfní. Retestováním těchto párů primerů na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého jsem potvrdila polymorfismus u 17 mikrosatelitů. Následně jsem vyřadila mikrosatelit Oc87B, který poskytl monomorfní produkt a v mé bakalářské práci byl chybně označen jako polymorfní. U ostatních mikrosatelitů jsem podle potřeby upravovala podmínky PCR amplifikace (teploty *annealingu* a koncentraci hořčnatých iontů) a elektroforetické separace (čas). Všechny páry primerů, které amplifikovaly polymorfní produkt, pocházely od zástupců z řádu trubkonosí a to z čeledi albatrosovití (1 pár), buňňákovití (13 párů) a buňňáčkovití (3 páry). Tyto mikrosatelity jsem amplifikovala na genomické DNA 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého a následně analyzovala a charakterizovala pomocí dvou populačně-genetických programů Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008).

V rámci čeledi albatrosovití jsem charakterizovala pouze jeden mikrosatelit (De7), který pocházel od albatrose stěhovavého (*Diomedea exulans*). Od druhů z čeledi buňňákovití jsem amplifikovala 13 párů primerů, konkrétně Paequ10 od buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), Parm02 a Parm05 od buňňáka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*), Ptero02, Ptero04 a Ptero09 od buňňáka havajského (*P. sandwichensis*), Puff G2C a Puff G2F od buňňáka baleárského (*Puffinus mauretanicus*), Pc A107 a Pc D103 od buňňáka světlonohého (*P. carneipes*), Bb22 a Bb23 od buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) a Pacbel_07265 od buňňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*). Od druhů z čeledi buňňáčkovití jsem charakterizovala 3 mikrosatelitní lokusy a to Oc28B, který pocházel od buňňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*) a dále pak Omn8 a Omn23 od buňňáčka Monteirova (*O. monteiroi*). Všechny mikrosatelity jsem srovnala s výsledky z níže uvedených studií (viz Tabulka č. 6).

Burg (1999) ve své práci izolovala a charakterizovala 26 mikrosatelitních lokusů u dvou druhů albatrose, a to šedohlavého a stěhovavého. Tyto lokusy charakterizovala na 50 jedincích albatrose šedohlavého, 50 jedincích albatrose černobrvého a 90 jedincích albatrose stěhovavého. Při amplifikaci mikrosatelitu De7 použila dvě teploty *annealingu*, kdy prvních sedm cyklů probíhalo při teplotě 48 °C a dalších 25 cyklů při 52 °C. Autorka

u všech tří druhů nalezla po dvou alelách. Já jsem tento mikrosatelit amplifikovala při T_a 59 °C a nalezla jsem stejně jako autorka 2 alely. Srovnání jejich výsledků s mými je shrnuto v tabulce č. 6.

Techow *et O’Ryan* (2004) izolovali 6 mikrosatelitních lokusů pocházejících od buňňáka bělobradého. Tyto lokusy testovali na 69 jedincích. Při amplifikaci mikrosatelitu Paequ10 použili teplotu *annealingu* 55 °C a našli 7 alel. Následně provedli *cross-species* PCR amplifikaci na šesti dalších druzích z řádu trubkonosí a to na buňňáku tristsanském, obrovském a Hallovu, dále pak na albatrosu černobrvém, šedohlavém a stěhovavém. S výjimkou albatrose stěhovavého, byl mikrosatelit u zbývajících pěti druhů polymorfní. Počet alel autoři neuvádějí. Ve své práci jsem mikrosatelit Paequ10 amplifikovala při T_a 63 °C a nalezla jsem 2 alely.

Brown *et Jordan* (2009) izolovali 6 mikrosatelitních lokusů od buňňáka trinidadského. Mikrosatelit Parm02 amplifikovali při T_a 55 °C a detekovali 4 alely. Mikrosatelit Parm05 označili jako monomorfní. Dále provedli *cross-species* PCR amplifikaci u 17 druhů z řádu trubkonosí a u tučňáka žltorohého. Parm02 byl polymorfní u 17 jedinců buňňáka proměnlivého, 12 jedinců buňňáka bělobradého a 8 jedinců buňňáka holubího u všech se 3 alelami, u 1 jedince buňňáka modravého se 2 alelami a u 8 jedinců tučňáka žltorohého s 5 alelami. Parm05 byl polymorfní u 17 jedinců buňňáka proměnlivého a 8 jedinců buňňáka kapverdského u obou se 2 alelami a u 8 jedinců buňňáka madeirského se 3 alelami. Dále otestovali dalších 53 mikrosatelitních lokusů pomocí *cross-species* PCR amplifikace u buňňáka trinidadského, kdy polymorfní produkt poskytlo 6 z nich, a to Paequ3 a Paequ13 (buňňák bělobradý), 10C5, 12H8 a De11 (albatros stěhovavý) a Calex01 (kulík mořský). Já jsem u mikrosatelitu Parm02 nalezla 3 alely při T_a 65 °C a u mikrosatelitu Parm05 2 alely při T_a 57 °C.

Welch *et Fleischer* (2011) popsali 10 mikrosatelitních lokusů od buňňáka havajského. Při testování na 40 jedincích při teplotě *annealingu* 53 °C našli u mikrosatelitu Ptero02 5 alel, u Ptero04 8 alel a u Ptero09 7 alel. Já jsem u mikrosatelitu Ptero02 nalezla 4 alely při T_a 55 °C, u mikrosatelitu Ptero04 3 alely při T_a 66 °C a u Ptero09 4 alely při T_a 61 °C.

Gonzalez *et al.* (2009) charakterizovali 10 polymorfních mikrosatelitních lokusů od 54 jedinců buňňáka baleárského. U mikrosatelitu Puff G2C našli při T_a 50 °C 7 alel. U Puff G2F při T_a 60 °C 2 alely. Všechny mikrosatelity následně amplifikovali na 23 jedincích buňňáka středomořského. Puff G2C vykazoval polymorfismus se 6 alelami.

Lokus Puff G2F byl monomorfní. Já jsem u mikrosatelitu Puff G2C našla 4 alely při T_a 52 °C a u mikrosatelitu Puff G2F stejně jako autoři 2 alely při 60 °C.

Hardesty *et al.* (2013) našli 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů u buňáka světlonohého. Jejich variabilitu testovali na 84 jedincích tohoto druhu. Lokus Pc A107 amplifikovali při T_a 55,2 °C a našli 5 alel. U lokusu Pc D103 detekovali 6 alel při T_a 58,7 °C. V této práci jsem použila teplotu *annealingu* u mikrosatelitu Pc A107 56 °C a našla 2 alely. U lokusu Pc D103 jsem použila T_a 51 °C a našla jsem 4 alely.

Andris *et al.* (2010) charakterizovali 11 mikrosatelitních lokusů u buňáka Bulwerova. Mikrosatelity Bb22 a Bb23 amplifikovali při teplotě *annealingu* 58 °C a našli 2 a 3 alely na lokus. U mikrosatelitu Bb22 jsem použila T_a 60 °C a našla jsem stejně jako autoři 2 alely. Mikrosatelit Bb23 vykazoval polymorfismus také se 2 alelami při T_a 51 °C. Autoři článku také provedli *cross-species* PCR amplifikaci u buňáka bělobradého a modravého a u buňáčka Monteirova. Lokus Bb22 byl polymorfní u všech tří druhů. Lokus Bb23 byl polymorfní pouze u obou buňáků. Počty alel ani testovaných jedinců autoři neuvádějí.

Moodley *et al.* (2015) izolovali 25 polymorfních mikrosatelitních markerů od buňáka útlozobého. Autoři u 74 jedinců tohoto druhu našli u lokusu Pacbel_07265 15 alel při T_a 56 °C. Já jsem u tohoto mikrosatelitu našla 5 alel při T_a 52 °C. Autoři tyto mikrosatelity také otestovali pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 118 jedinců buňáka širokozobého, 79 jedinců buňáka holubího, 18 jedinců buňáka Salvinova, 35 jedinců buňáka hrdliččího, 99 jedinců buňáka modravého a 6 jedinců buňáčka Wilsonova. Lokus Pacbel_07265 byl polymorfní u všech zmíněných druhů s počtem alel: 14 u buňáka širokozobého, 15 u buňáka holubího, 7 u buňáka Salvinova, 6 u buňáka hrdliččího, 28 u buňáka modravého a 5 u buňáčka Wilsonova.

Sun *et al.* (2009) charakterizovali 10 mikrosatelitních lokusů od buňáčka madeirského a dlouhokřídleho. Jejich variabilitu otestovali na 27 jedincích buňáčka madeirského, 22 jedincích buňáčka Monteirova a 24 jedincích buňáčka dlouhokřídleho. Lokus Oc28B amplifikovali při T_a 50 °C a byl polymorfní u buňáčka madeirského a Monteirova u obou se 3 alelami. Já jsem tento lokus amplifikovala při T_a 52 °C a našla jsem 2 alely.

Bried *et al.* (2012) u buňáčka Monteirova popsali 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Variabilitu těchto lokusů testovali na 125 jedincích tohoto druhu. Oba lokusy amplifikovali při T_a 58 °C. U lokusu Omn8 našli 10 alel a u lokusu Omn23

4 alely. Já jsem tyto mikrosatelity amplifikovala při T_a 59 °C, respektive 61 °C. U lokusu Omn8 jsem našla 6 alel a u lokusu Omn23 2 alely. Autoři článku také provedli *cross-species* PCR amplifikaci u buřňáčka madeirského, buřňáka Bulwerova a modravého. Polymorfni byl pouze lokus Omn8, a to u buřňáčka madeirského. Počty alel ani testovaných jedinců autoři neuvádějí.

Tabulka č. 6: Srovnání mikrosatelitních lokusů, které byly původně nalezeny u níže zmíněných zdrojových druhů s výsledky *cross-species* PCR amplifikace na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého (tato práce). V tabulce je uveden název mikrosatelitu, zdrojový druh, počet jedinců, literární zdroj, teplota *annealingu* (T_a), délka elektroforetické separace (ELFO) a počty nalezených alel. * značí snížení koncentrace hořčičných iontů v PCR reakční směsi na $3/4$. Δ značí snížení koncentrace hořčičných iontů v PCR reakční směsi na $2/3$.

Mikrosatelit	Zdrojový druh	Počet jedinců	T_a [°C]	N	Literární zdroj	Čáp bílý, 23 jedinců (tato práce)		
						T_a [°C]	ELFO [min]	N
De7	Albatros stěhovavý	90	48 a 52	2	Burg, 1999	59	90	2
Paequ10	Buřňák bělobradý	69	55	7	Techow <i>et al.</i> , 2004	63	160	2
Parm02	Buřňák trinidadský	Chybí	55	4	Brown <i>et al.</i> , 2009	65	120	3
Parm05				1		57	90	2
Ptero02	Buřňák havajský	40	53	5	Welch <i>et al.</i> , 2011	55	120	4
Ptero04				8		66	120	3
Ptero09				7		61	120	4
Puff G2C	Buřňák baleárský	54	50	7	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009	52	120	4
Puff G2F			60	2		60 Δ	180	2
Pc A107	Buřňák světlonohý	84	55,2	5	Hardesty <i>et al.</i> , 2013	56	180	2
Pc D103			58,7	6		51	90	4
Bb22	Buřňák Bulwerův	Chybí	58	2	Andris <i>et al.</i> , 2010	60	90	2
Bb23				3		51	90	2
Pacbel_07265	Buřňák útlozobý	74	56	15	Moodley <i>et al.</i> , 2015	52*	90	5
Oc28B	Buřňáček madeirský	27	50	3	Sun <i>et al.</i> , 2009	52	90	2
Omn8	Buřňáček Monteirův	125	58	10	Bried <i>et al.</i> , 2012	59	90	6
Omn23				4		61	90	2

Srovnání polymorfních mikrosatelitních lokusů od druhů z řádu trubkonosí u čápa bílého a dalších testovaných druhů z kladu Aequorlitornithes

V Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL, se po mnoho let testuje variabilita mikrosatelitů z řádu trubkonosí. Celkově bylo na toto téma zpracováno 10 bakalářských a 8 (včetně této) diplomových prací. Studium polymorfních mikrosatelitů u nesyta indomalajského se ve své diplomové práci zabývala Nedvěďová (2015). Janušová (2015) ve své bakalářské práci provedla *cross-species* PCR amplifikaci u potápky roháče a vybrané polymorfní mikrosatelity následně charakterizovala ve své diplomové práci (Janušová, 2017). Verešová (2018) ve své bakalářské práci našla polymorfní mikrosatelity u pelikána kadeřavého, které pak následně charakterizovala ve své diplomové práci (Verešová, 2020). U plameňáka karibského byly mikrosatelity pocházející od zástupců z řádu trubkonosí nejprve amplifikovány v bakalářské práci Strejčkové (2016), která je následně i ve své diplomové práci (Strejčková, 2018) charakterizovala. Zlochová (2019) ve své diplomové práci charakterizovala polymorfní mikrosatelity nalezené u plameňáka růžového, tím navázala na výsledky bakalářské práce Kůrové (2017). Hudzieczková (2019) ve své bakalářské práci našla polymorfní mikrosatelity u pelikána bílého, na její práci navázala svou diplomovou práci Adámková (2021). U pelikána afrického provedla Kopečná (2018) *cross-species* PCR amplifikaci a vybrané polymorfní mikrosatelity následně charakterizovala ve své diplomové práci (Kopečná, 2020). Macková (2021) testovala mikrosatelity z řádu trubkonosí na pelikánu skvrnozobém. Kopecký (2022) ve své bakalářské práci provedl *cross-species* PCR amplifikaci u čápa simbila. Musilová (2022) ve své bakalářské práci testovala variabilitu na čápu černém. U čápa bílého jsem polymorfismus těchto mikrosatelitů testovala ve své bakalářské práci (Krňávková, 2021) a nalezené polymorfní mikrosatelity jsem charakterizovala v této diplomové práci. Srovnání výsledků této práce s výsledky dalších studentů, kteří se zabývali testováním mikrosatelitů z řádu trubkonosí, je uvedeno v tabulce č. 7.

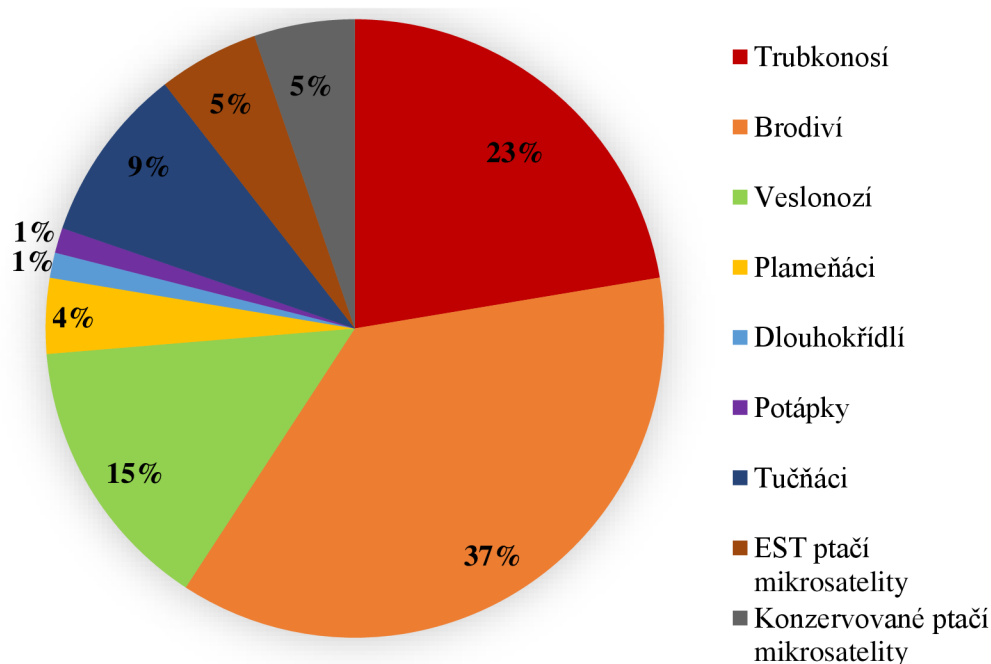
Tabulka č. 7: Přehled mikrosatelitních lokusů z řádu trubkonosí, které jsou polymorfni u čápa bílého (tato práce) a u dalších 10 druhů z kladu Aequorlitorornithes, u kterých byly tyto mikrosatelity také testovány. Jedná se konkrétně o: nesyta indomalajského (Nedvědová, 2015), plameňáka karibského (Strejčková, 2018), plameňáka růžového (Zlochová, 2019), čápa simbila (Kopecký, 2022), pelikána bílého (Adámková, 2021), potápku roháče (Janušová, 2017), pelikána skvrnozobého (Macková, 2021), pelikána afrického (Kopečná, 2020), čápa černého (Musilová, 2022) a pelikána kadeřavého (Verešová, 2020). Číslem je označen počet alel, M = monomorfni lokus, U = polymorfni nehodnotitelný lokus, NA = žádná amplifikace. V závorkách jsou uvedeny počty jedinců.

Mikrosatelitní lokus	Čáp bílý (23)	Nesyt indomalajský (6)	Plameňák karibský (30)	Plameňák růžový (22)	Čáp simbil (6)	Pelikán bílý (21)	Potápka roháč (13)	Pelikán skvrnozobý (6)	Pelikán africký (12)	Čáp černý (6)	Pelikán kadeřavý (41)
Omn8	6	4	7	8	6	7	9	4	4	3	M
Pc D103	4	2	3	2	3	M	2	M	M	NA	M
Pachel_07265	5	2	3	2	2	M	M	2	M	M	M
Oc28B	2	M	3	4	M	4	M	2	M	M	M
Ptero09	4	2	M	M	3	4	M	M	M	M	M
Puff G2F	2	2	3	3	M	M	M	M	M	M	M
Bb22	2	2	2	2	M	M	M	M	M	M	M
Ptero02	4	5	M	M	4	M	M	M	NA	M	M
Parm02	3	4	M	M	M	4	M	M	M	M	M
Puff G2C	4	3	U	U	2	M	M	M	M	M	M
Omn23	2	2	M	M	M	M	M	M	2	M	M
Ptero04	3	M	M	M	M	3	M	M	M	M	M
De7	2	M	M	M	M	M	3	M	NA	M	M
Parm05	2	3	M	M	M	M	M	M	NA	M	M
Pc A107	2	M	2	M	M	M	M	M	M	M	M
Paequ10	2	M	M	M	M	M	M	M	M	2	M
Bb23	2	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

Mezi nejpolymorfnější mikrosatelity patřil lokus Omn8, který byl polymorfní u 10 z 11 testovaných druhů. Dále pak lokusy Pc D103 a Pacbel_07265, které byly polymorfní u 6 z 11 testovaných druhů. Lokus Oc28B byl polymorfní u 5 druhů. Lokusy Bb22, Ptero09 a Puff G2F u 4 druhů. Lokusy Parm02, Omn23, Ptero02 a Puff G2C u 3 druhů. Dalších 5 lokusů (De7, Parm05, Pc A107, Ptero04 a Paequ10) bylo polymorfních u 2 druhů. Poslední lokus Bb23 byl polymorfní pouze u čápa bílého.

Testované mikrosatelity u čápa bílého

Celkově bylo u čápa bílého testováno 783 párů primerů a to v 7 pracích (Obručová, 2009; Burianová, 2011; Fišerová, 2014; Gajdošíková, 2020; Krňávková, 2021; Macková, osobní sdělení; tato práce). Polymorfní produkt poskytlo 76 párů primerů z nichž 5 ještě nebylo plně charakterizováno na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého, úspěšnost nalezení polymorfního produktu tedy činí přibližně 9 %. Burianová (2011) ve své diplomové práci charakterizovala 31 polymorfních mikrosatelitních lokusů na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého s počtem alel od 2 do 10. Mikrosatelitní lokusy pocházely od zástupců z řádů: brodiví (Ciconiiformes) (16), dlouhokřídli (Charadriiformes) (1), plameňáci (Phoenicopteriformes) (3) a veslonoží (Pelecaniformes) (11). Dále pak charakterizovala dalších 8 mikrosatelitů pocházejících přímo od čápa bílého s počtem alel od 2 do 23. Fišerová (2014) ve své diplomové práci našla 5 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého s počtem alel od 2 do 4. Lokusy pocházely od zástupců z řádů brodiví (Ciconiiformes) (4) a potápky (Podicipediformes) (1). Macková ve své dokončované diplomové práci charakterizovala 15 mikrosatelitních lokusů na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého s počtem alel od 2 do 4. Použité mikrosatelity pocházely od zástupců z řádu tučňáci (Sphenisciformes) (7), dále byly použity EST ptačí mikrosatelity (4) a konzervované ptačí mikrosatelity (4) (osobní sdělení). Já jsem v této diplomové práci charakterizovala 17 polymorfních mikrosatelitních lokusů na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého s počtem alel od 2 do 6. Použité mikrosatelity pocházely od zástupců z řádu trubkonosí (17). Nejvíce polymorfních mikrosatelitních lokusů je v rámci řádu brodiví a to 28, dále pak v rámci řádu trubkonosí jich je 17, v rámci veslonožích 11, tučňáků 7, EST ptačích mikrosatelitů 4, konzervovaných ptačích mikrosatelitů 4, plameňáků 3, dlouhokřídli 1 a potápek také 1 (viz Obrázek č. 6). Uvedené řady jsou ve starém pojetí systému.



Obrázek č. 6: Procentuální zastoupení 76 polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa bílého, vzhledem k jejich zdrojovému řádu ve starém pojetí systému.

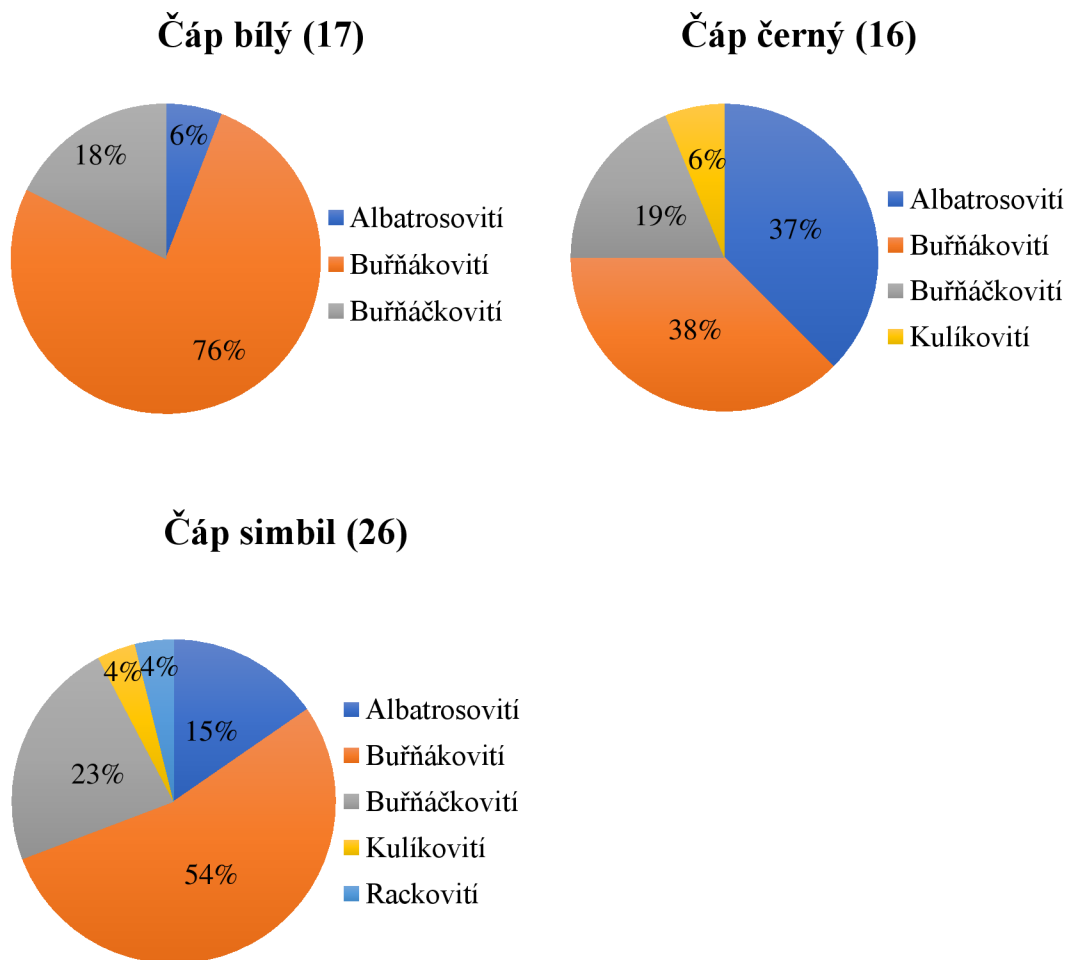
Amplifikace mikrosatelitních lokusů z řádu trubkonosí u rodu *Ciconia*

V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL bylo u tří druhů (čáp bílý, černý a simbil) z rodu *Ciconia* otestováno 213 párů primerů z nichž 207 pocházelo od zástupců z řádů trubkonosí, 5 od zástupců z řádu dlouhokřídli a 1 z řádu pěvci. Těchto dalších 6 párů primerů bylo použito kvůli tomu, že byly polymorfní u některých druhů z řádu trubkonosí.

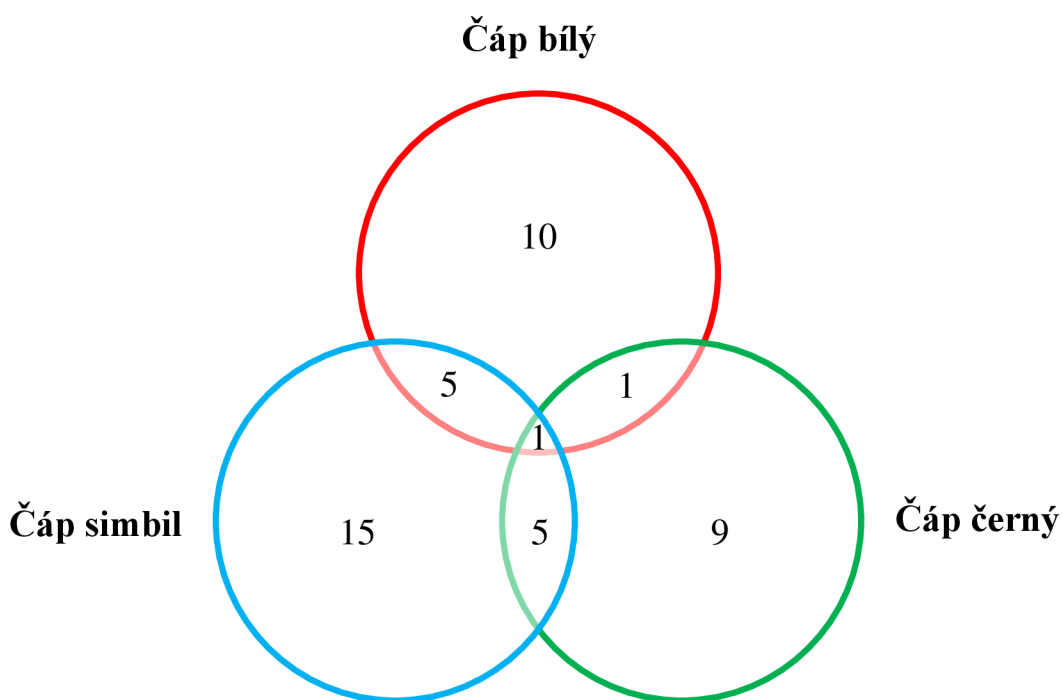
V průběhu mé diplomové práce jsem u čápa bílého amplifikovala 18 párů primerů, kdy polymorfní produkt poskytlo 17 z nich. Úspěšnost nalezení polymorfního lokusu u čápa bílého činila přibližně 8 %. Musilová (2022) našla u čápa černého (*Ciconia nigra*) 16 polymorfních mikrosatelitních lokusů s počtem alel od 2 do 4. Úspěšnost činila 7,5 %. Kopecký (2022) amplifikoval u čápa simbila (*Ciconia abdimii*) 26 párů primerů s počtem alel od 2 do 6. Úspěšnost amplifikace polymorfního produktu byla přibližně 12 %. Jedná se tak o druh s nejvyšší úspěšností amplifikace polymorfního produktu u rodu *Ciconia*.

Při porovnání polymorfních produktů u čápa bílého s ostatními testovanými čápy jsem zjistila největší shodu s čápem simbilem a to 6 polymorfních mikrosatelitů. Čáp černý a čáp bílý společně měli pouze 2 polymorfní mikrosatelity. Všechny tři druhy čápů měly polymorfní mikrosatelit Omn8. Čáp simbil s čápem černým měli společných 6 polymorfních mikrosatelitů (viz Obrázek č. 8). U čápa bílého byly polymorfní

mikrosatelity pouze z čeledí v rámci řádu trubkonosí (albatrosovití, buňňákovití a buňňáčkovití), u čápa černého navíc z čeledi kulíkovití, která patří do řádu dlouhokřídlí. U čápa simbila byly polymorfní mikrosatelity z řádu trubkonosí (albatrosovití, buňňákovití a buňňáčkovití) a dlouhokřídlí (kulíkovití a rackovití). Srovnání procentuálního zastoupení polymorfních mikrosatelitních lokusů u tří druhů čápů je uvedeno na obrázku č. 7.



Obrázek č. 7: Srovnání procentuálního zastoupení párů primerů amplifikujících mikrosatelity z řádů trubkonosí a dlouhokřídlí u tří druhů rodu *Ciconia*.



Obrázek č. 8: Polymorfnní mikrosatelity pocházející od druhů z řádů trubkonosí a dlouhokřídli, které byly polymorfnní u tří druhů rodu *Ciconia*: (čáp bílý (tato práce), čáp černý (Musilová, 2022) a čáp simbil (Kopecký, 2022)). S vyjádřením polymorfnnosti u jednoho, dvou, respektive tří druhů současně.

U čápa bílého bylo v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL zatím testováno 783 párů primerů. Většina z nich pocházela od zástupců z řádů brodiví, dlouhokřídli, plameňáci, pěvci, potáplice, trubkonosí, tučňáci, veslonoží a dále EST ptačí mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity. Celkově bylo nalezeno 76 polymorfnních produktů, kdy 71 z nich již bylo plně charakterizováno na 23 jedincích čápa bílého. Zbývajících 5 mikrosatelitů z diplomové práce Fišerové (2014) by v budoucnu mělo být společně s 11 dalšími páry primerů od čápa bílého (Turjeman *et al.*, 2016) plně charakterizováno na 23 jedincích tohoto druhu. Dále by měly být otestovány nově publikované mikrosatelity v rámci kladu Aequirornithes od řádů, které již polymorfnní produkt u čápa bílého poskytly (Rodrigues *et al.*, 2017) a také mikrosatelity od zástupců z řádu slunatci (Eurypygiformes) a dlouhokřídli (Charadriiformes) (Farrell *et al.*, 2012), které s výjimkou 5 párů primerů od tří druhů z řádu dlouhokřídli u čápa bílého nebyly testovány. To by mohlo vést k rozšíření polymorfnních mikrosatelitů u tohoto druhu.

7 Závěr

V této diplomové práci jsem se zabývala analýzou a charakterizací 18 polymorfních mikrosatelitů na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého (*Ciconia ciconia*).

Tyto lokusy jsem určila jako polymorfní ve své bakalářské práci (Krňávková, 2021) pomocí testování na 6 nepříbuzných jedincích čápa bílého. Páry primerů pocházely od zástupců z řádu trubkonosí konkrétně: 1 z čeledi albatrosovití, 13 z čeledi buňňákovití a 4 z čeledi buňňáčkovití.

Při testování výše zmíněných párů primerů na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého jsem našla polymorfní produkt u 17 z nich, počet alel se pohyboval od 2 do 6. Jeden mikrosatelitní lokus jsem vyřadila jako monomorfní. U těchto mikrosatelitních lokusů jsem kromě počtu alel a genotypů pomocí softwarů Cervus 3.0.7 a Genepop 4.7.5 vyjádřila jejich charakteristiky a otestovala vazbu.

U čápa bílého je v současné době nalezeno 76 polymorfních lokusů, z nichž 71 je již plně charakterizováno na 23 nepříbuzných jedincích čápa bílého a zbývajících 5 je potřeba v budoucnu ještě charakterizovat.

8 Literatura

Abdul-Muneer, P. M. (2014): Application of Microsatellite Markers in Conservation genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International*, 1–11.

Abdurakhmonov, I. Y. (2016): Introduction to Microsatellites: Basics, Trends and Highlights. *Intech Open*, 1–16.

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

Adámková, V. (2021): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Al Rubaiee, Z., Al Murayati, H., Tobolka, M., Tryjanowski, P., Møller, A. P. (2021): Not so black, not so white: differences in microorganism load of contiguous feathers from white stork chicks. *Current Zoology*, 67, 263–270.

Al-Samarai, F. R., Al-Kazaz, A. A. (2015): Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9, 118–130.

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, dostupné online na: <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>, navštíveno dne 7. 3. 2023.

Arslangümdoğdu, Dalyan, C., Bacak, E., Yardim, Ü., Gezgin, C., Beşkardeş, V. (2013): Spring migration of the White Stork, *Ciconia ciconia*, and the Black Stork, *Ciconia nigra* over the Bosphorus (Aves: Ciconiidae). *Zoology in the Middle East*, 53, 7–13.

Arslangümdoğdu, Z., Bacak, E., Beşkardeş, V., Dalyan, C., Smith, L., Payne, M. R., Yardim, Ü. (2017): Autumn migration of the White Stork, *Ciconia ciconia*, and the Black Stork, *C. nigra* over the Bosphorus (Aves: Ciconiidae). *Zoology in the Middle East*, 63, 103–108.

- Bagshaw, A. T. M. (2017): Functional Mechanism of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes. *Genome Biology and Evolution*, 9, 2428–2443.
- BirdLife International (2023) Species factsheet: *Ciconia ciconia*. Dostupné online na: <http://datazone.birdlife.org/species/factsheet/white-stork-ciconia-ciconia>, navštíveno dne 6. 2. 2023.
- Bjedov, D., Mikuška, A., Lackmann, C., Begović, L., Mikuška, T., Velki, M. (2021): Application of Non-Destructive Methods: Biomarker Assays in Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*) Nestlings. *Animals*, 11, 1–17.
- Bocheński, M., Jerzak, L. (2006): Behaviour of the White Stork *Ciconia ciconia*: a review. In: P. Tryjanowski, T. H. Sparks, & L. Jerzak (Eds.), *The White Stork in Poland: Studies biology, ecology and conservation*. Poznań: Bogucki Wydawnictwo Naukowe, 295–324.
- Bried, J., Andris, M., Dubois, M. P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*. Manuskript, dostupné online na: <https://www.yumpu.com/en/document/48view/39976169/eighteen-polymorphic-microsatellite-markers-in-monteiros-storm>, navštíveno dne 7. 3. 2023.
- 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.
- Burianová, E. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Farrell, L., Dawson, D., Horsburgh, G., Burke, T., Lank, D. (2012): Isolation, characterization and predicted genome locations of ruff (*Philomachus pugnax*, AVES) microsatellite loci. *Conservation Genetics Resources*, 4, 763–771.

- 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.
- Freitas, P. D., Martins, D. S., Galettijr, P. M. (2008): CID: a rapid and efficient bioinformatic tool for the detection of SSRs from genomic libraries. *Molecular Ecology Resources*, 8, 107–108.
- Gajdošíková, T. (2020): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Gill, F., Donsker, D., Rasmussen, P. (2023): IOC World Bird List (v13.1) dostupné online na: <https://www.worldbirdnames.org/new/>, navštíveno dne 4. 2. 2023.
- Golawski, A., Kasprzykowski, Z. (2021): Alternative foraging strategies in the white stork *Ciconia ciconia*: The effect of moving meadows. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 319, 1–7.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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): Analýza a charakteristika vybraných *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorornithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

- Kahl, M. P. (1972): Comparative Ethology of the Ciconidae. Part 4: The „Typical“ Storks (Genera *Ciconia*, *Sphenorhynchus*, *Dissoura* and *Euxenura*). Zeitschrift für Tierpsychologie, 30, 225–252.
- Kalinowski, S., Taper, M., Marshall, T. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases succes in paternity assignment. Molecular Ecology, 16, 1099–1106.
- Kopecký, O. (2022): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kopečná, K. (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 řádu trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Krňávková, P. (2021): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- 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.
- Loucif, L., Chelaghma, W., Cherak, Z., Bendjama, E., Beroual, F., Rolain, J. (2022): Detection of NDM-5 and MCR-1 antibiotic resistance encoding genes in Enterobacterales in long-distance migratory bird species *Ciconia ciconia*, Algeria. Science of the Total Environment, 814, 1–7.
- Macková, B. (2021): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

- Marcelino, J., Franco, A. M. A., Acácio, M., Soriano-Redondo, A., Moreira, F., Catry, I. (2023): Anthropogenic food subsidies reshape the migratory behaviour of a long-distance migrant. *Science of the Total Environment*, 858, 1–10.
- Mason, A. S. (2015): SSR Genotyping. In: Batley J. (Ed.) *Plant Genotyping*. Springer, New York, 77–89.
- Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Puteh, A. B., Rahim, H. A., Islam, Kh. N., Latif, M. A. (2013): A Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 22499–22528.
- 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., Ryam, P. G., Suazo, C. G., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046–1058.
- Musilová, K. (2022): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa černého (*Ciconia nigra*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Nedvědová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Nunome, T., Negoro, S., Miyatake, K., Yamaguchi, H., Fukuoka, H. (2006): A protocol for the construction of microsatellite enriched genomic library. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24, 305–312.
- Obručová, E. (2009): Polymorfni DNA mikrosatelity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Pineda-Pampliega, J., Ramiro, J., Herrera-Duenas, A., Martinez-Haro, M., Hernández, J. M., Aguirre, J. I., Höfle, U. (2021): A multidisciplinary approach to the evaluation of the effects of foraging on landfills on white stork nestlings. *Science of the Total Environment*, 775, 1–11.

- Putman, A. I., Carbone, I. (2014): Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution*, 4, 4399–4428.
- Rodrigues, P., Micael, J., Hernández, C., Verdugo, C. (2017): Characterization of 11 Microsatellite DNA Markers from the Neotropic Cormorant (*Phalacrocorax Brazilianus*). *Avian Biology Research*, 10, 45–48.
- Rousset, F. (2008): GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Sangster, G., Mayr, G. (2021): Feraequornithes: a name for the clade formed by Procellariiformes, Sphenisciformes, Ciconiiformes, Suliformes and Pelecaniformes (Aves). *Vertebrate Zoology*, 71, 49–53.
- Shephard, J. M., Galbusera, P., Hellemans, B., Jusic, A., Akhandaf, Y. (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservatory Genetics*, 10, 1525–1528.
- Shephard, J. M., Ogden, R., Tryjanowski, P., Olsson, O., Galbusera, P. (2013): Is population structure in the European white stork determined by flyway permeability rather than translocation history? *Ecology and Evolution*, 3, 4881–4895.
- Sjakste, T., Paramonova, N., Sjakste, N. (2013): Functional Significance of Microsatellite Markers. *Medicina (Kaunas)*, 49, 505–509.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Strejčková, B. (2018): Analýza a charakteristika vybraných *cross-species* mikrosatelitů z řádu trubkonosí 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.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004) Characterization of microsatellite loci in White-chinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes*, 4, 33–35.

- Tomasulo-Seccomandi, A. M., Schable, N. A., Bryan, A. L., Jr., Brisbin, I. L., Jr., Del Lama, S. N., Glenn, T. C. (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 563–566.
- Trivedi, S. (2004): Microsatellites (SSRs): Puzzles within puzzle. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 331–347.
- Turjeman, S. F., Centeno-Cuadros, A., Nathan, R. (2016): Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite markers for the white stork, *Ciconia ciconia*: applications in individual-based and population genetics. *Animal Biodiversity and Conservation*, 39, 11–16.
- Turjeman, S., Eggers, U., Rotics, S., Fiedler, W., Centeno-Cuadros, A., Kaatz, M., Zurell, D., Jeltsch, F., Wikelski, M., Nathan, R. (2021): Estimating nest-switching in free-ranging wild birds: an assessment of the most common methodologies, illustrated in the White Stork (*Ciconia ciconia*). *Ibis*, 163, 1100–1119.
- Van Den Bussche, R. A., Harmon, S. A., Baker, R. J., Bryan, A. L. Jr., Rodgers, J. A. Jr., Harris, M. J., Brisbin, I. H. Jr. (1999): Low levels of genetic variability in north american populations of the wood stork (*Mycteria americana*). *The Auk*, 116, 1083–1092.
- Verešová, D. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Verešová, D. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu 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.
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., de Freitas Munhoz, C. (2016): Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 312–328.
- Wang, H., Lou, X., Qionqiong, Z., Huang, Y., Zhou, L., Zhang, B. (2011): Isolation and Characterization of Microsatellite DNA Markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science*, 28, 606–608.

Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). Conservation Genetics Resources, 3, 581–584.

Zbyryt, A., Dylewski, L., Neubauer, G. (2021): Mass of white stork nests predicted from their size: Online calculator and implications for conservation. Journal for Nature Conservation, 60, 1–7.

Zlochová, A. (2019): Amplifikace vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

9 Příloha

Příloha č. 1: Charakteristika 17 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 23 nepříbuzných jedinců čápa bílého. Výstup z programu Cervus 3.0.7.

Lokus	k	H _{Obs}	H _{Exp}	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (Null)
De7	2	0,174	0,162	0,146	0,987	0,927	0,870	0,720	0,851	ND	-0,0380
Paequ10	2	0,435	0,394	0,311	0,926	0,844	0,757	0,452	0,670	NS	-0,0599
Parm02	3	0,652	0,666	0,577	0,788	0,642	0,493	0,196	0,473	NS	0,0010
Parm05	2	0,261	0,232	0,201	0,974	0,899	0,829	0,624	0,792	ND	-0,0654
Ptero02	4	0,696	0,666	0,597	0,769	0,605	0,432	0,176	0,468	NS	-0,0435
Ptero04	3	0,652	0,587	0,482	0,835	0,720	0,585	0,274	0,531	NS	-0,0663
Ptero09	4	0,783	0,693	0,618	0,748	0,586	0,415	0,163	0,452	NS	-0,0706
Puff G2C	4	0,522	0,650	0,582	0,791	0,618	0,444	0,187	0,479	NS	0,1128
Puff G2F	2	0,174	0,232	0,201	0,974	0,899	0,829	0,624	0,792	ND	0,1321
Pc A107	2	0,565	0,496	0,367	0,882	0,816	0,724	0,383	0,603	NS	-0,0765
Pc D103	4	0,696	0,679	0,605	0,760	0,600	0,430	0,172	0,461	NS	-0,0491
Bb22	2	0,217	0,198	0,175	0,981	0,913	0,848	0,669	0,820	ND	-0,0516
Bb23	2	0,087	0,085	0,080	0,997	0,960	0,925	0,844	0,919	ND	-0,0131
Pacbel_07265	5	0,913	0,739	0,673	0,697	0,525	0,349	0,127	0,420	NS	-0,1260
Oc28B	2	0,435	0,510	0,375	0,875	0,813	0,719	0,375	0,594	NS	0,0688
Omn8	6	0,739	0,785	0,730	0,631	0,453	0,271	0,092	0,389	NS	0,0267
Omn23	2	0,043	0,125	0,114	0,993	0,943	0,895	0,778	0,884	ND	0,4395

Legenda:

k	počet nalezených alel na lokusu
H _{Obs}	pozorovaná heterozygotnost
H _{Exp}	očekávaná heterozygotnost
PIC	vypovídací hodnota lokusu
NE-1P	pravděpodobnost chybného přiřazení prvního rodiče k mláděti v případě, že není znám ani jeden z rodičů

NE-2P	pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče k mláděti v případě, že je znám první z rodičů
NE-PP	pravděpodobnost chybného přiřazení rodičovského páru k mláděti
NE-I	pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfních lokusů u dvou náhodně vybraných nepříbuzných jedinců
NE-SI	pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfních lokusů u dvou příbuzných mláďat
HW	soulad/odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy
NS	lokus je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
ND	lokus nelze vyhodnotit, zda je nebo není v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
F (null)	frekvence výskytu nulových alel

Number of individuals:	23
Number of loci:	17
Mean number of alleles per locus:	3,000
Mean proportion of loci typed:	1,0000
Mean expected heterozygosity:	0,4646
Mean polymorphic information content (PIC):	0,4020
Combined non-exclusion probability (first parent):	0,06425884
Combined non-exclusion probability (second parent):	0,00500855
Combined non-exclusion probability (parent pair):	0,00015421
Combined non-exclusion probability (identity):	$4,621 \cdot 10^{-9}$
Combined non-exclusion probability (sib identity):	0,0006426