Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky

Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), černého (*C. nigra*) a simbila (*C. abdimii*).

Diplomová práce

Bc. Eva Fišerová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

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

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

V Olomouci dne …… ……..

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a připomínky, poskytnuté materiály, ochotu, čas a trpělivost, kterou mi poskytl při psaní této diplomové práce. Děkuji také své rodině, která mě v průběhu studia podporovala a svým kolegyním z Laboratoře populační genetiky.

Souhrn

Tato diplomová práce byla vypracována na téma: Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), černého (*C. nigra*) a simbila (*C. abdimii*).

V teoretické části své diplomové práce jsem se zabývala charakteristikou řádu brodiví (Ciconiiformes), jeho čeledi čápovití (Ciconiidae) a rodu čáp (*Ciconia*), kam patří právě výše zmíněné tři druhy čápů. Dále jsem obecně popsala mikrosatelity jako molekulární markery. A v poslední kapitole jsem stručně charakterizovala všechny dodnes nalezené polymorfní mikrosatelitové lokusy u ptáků z řádů brodiví, dlouhokřídlí (Charadriiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes) a veslonozí (Pelecaniformes).

V experimentální části jsem se věnovala hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa bílého, čápa černého a čápa simbila. Využila jsem k tomu metodu *cross-species* PCR amplifikace a 31 párů primerů původně navržených pro jiné druhy z řádu brodiví a potápky. U čápa černého a čápa simbila jsem nenalezla žádné polymorfní produkty. U čápa bílého jsem detekovala 5 polymorfních mikrosatelitových lokusů s počtem alel 2-4.

V bakalářských pracích Nevimové (2012) a Novosadové (2012) bylo nalezeno celkem 50 párů primerů od druhů z řádu brodiví, dlouhokřídlí, plameňáci a veslonozí, které daly polymorfní produkty u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila. V mé práci bylo těchto 50 polymorfních lokusů genotypováno na 10 nepříbuzných jedincích čápa simbila. Pomocí statistického programu Cervus 3.0.3 byly získány detailní charakteristiky 46 hodnotitelných polymorfních lokusů a pomocí programu Genepop 4.1 byla určena částečná vazba mezi dvěma lokusy Wsμ17 a Wsμ18. Dále jsem u 5 polymorfních mikrosatelitových lokusů detekovala pravděpodobnou vazbu na chromozom Z a jeden lokus jsem vyhodnotila jako pohlavní marker.

Summary

I processed this master thesis on the topic: Analysis and characterization of polymorphic cross-species microsatellites in White Stork (*Ciconia ciconia*), Black Stork (*C. nigra*) and Abdim´s Stork (*C. abdimii*).

In the theoretical part of my master thesis I dealt with the description of the order Ciconiiformes, of its family Ciconiidae and genus *Ciconia*, which includes the above mentioned types of Storks. I also briefly described microsatellites as molecular markers. In the last chapter I descripted all known polymorphic microsatellite loci of the orders Ciconiiformes, Charadriiformes, Phoenicopteriformes, Podicipediformes and Pelecaniformes.

In the experimental part I focused on the search of polymorphic microsatellite loci in White Stork, Black Stork and Abdim´s Stork. I applied the method of cross-species PCR amplification, and I tested 31 primer pairs originally designed for the polymorphic microsatellites for birds belonging to orders Ciconiiformes and Podicipediformes. I did not find any polymophic loci in Black Stork and Abdim´s Stork. In White Stork I found 5 polymorphic microsatellite loci with the number of allele ranged from 2 to 4.

Totally 50 primer pairs designed for the polymorphic microsatellite loci for birds belonging to orders Ciconiiformes, Charadriiformes, Phoenicopteriformes and Pelecaniformes. They were polymorphic in 6 unrelated individuals of Abdimi´s Stork in bachelor thesis of Nevimová (2012) and Novosadová (2012). In my master thesis these 50 polymophic loci were genotyped in 10 unrelated individuals of the Abdim´s Stork. By analysing genotypes were obtained detail characteristics of 46 evaluable polymophic loci using a statistical program Cervus 3.0.3. The partial physical linkage was found out among two microsatellites, Wsμ17 a Wsμ18, using a statistical program Genepop 4.1. I also detected 5 sex-linked microsatellite loci probably linked to chromosome Z and one acted similar to a marker for sex determination.

Obsah

1. Úvod 7
2. Cíle práce 8
3. Literární přehled 9
3.1 Řád brodiví 9
3.1.1 Čeleď čápovití 10
3.1.2 Rod čáp 11
3.1.2.1 Čáp bílý 12
3.1.2.2 Čáp černý 13
3.1.2.3 Čáp simbil 14
3.2 Mikrosatelity 16
3.2.1 Mikrosatelity u čápa bílého 17
3.2.2 *Cross-species* mikrosatelity u čápa černého 18
3.2.3 *Cross-species* mikrosatelity u čápa simbila 19
3.2.4 Mikrosatelitové lokusy nalezené u druhů z řádu brodiví 21
3.2.5 Mikrosatelitové lokusy nalezené u druhů z řádu plameňáci 26
3.2.6 Mikrosatelitové lokusy nalezené u druhů z řádu potápky 26
3.2.7 Mikrosatelitové lokusy nalezené u druhů z řádu dlouhokřídlí 27
3.2.8 Mikrosatelitové lokusy nalezené u druhů z řádu veslonozí 28
4. Materiál a metody 32
4.1 Biologický materiál 32
4.2 Izolace genomické DNA 32
4.3 Mikrosatelity amplifikované u čápa bílého, čápa černého a čápa simbila 33
4.3.1 PCR amplifikace 36
4.3.2 Zpracování PCR produktů 38
4.4 Použité chemikálie 40
4.5 Použité roztoky 41
4.6 Laboratorní přístroje 43
5. Výsledky 44
6. Diskuze 59
7. Závěr 74
8. Seznam použitých zkratek 75
9. Použitá literatura 76

1. Úvod

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující sekvence se základní repetitivní jednotkou nepřesahující délku 6 bp. Nacházejí se v eukaryotických, prokaryotických ale i bakteriálních genomech, jak v kódujících tak nekódujících oblastech. Mikrosatelity patří v dnešní době k nejvyužívanějším molekulárním markerům a nacházejí uplatnění v mnoha oblastech genetiky včetně populačních studií, analýze paternity, konzervační genetice a další. Velký rozsah jejich využití je dán faktem, že jsou kodominantní, vysoce polymorfní a jejich studium je založeno na PCR, která je dobře reprodukovatelná

Cílem této diplomové práce bude nalézt polymorfní mikrosatelitové lokusy u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), čápa černého (*Ciconia nigra*) a čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Budou k tomu využity primery primárně navržené pro vybrané druhy z řádu brodiví a potápky a testovány pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace na 6 nepříbuzných jedincích všech tří druhů čápů. Dalším úkolem bude charakterizace již nalezených polymorfních mikrosatelitů u čápa simbila. Polymorfní mikrosatelitové lokusy u čápa simbila byly nalezeny v předchozích bakalářských pracích pomocí párů primerů původně navržených pro druhy z řádů brodiví, veslonozí, plameňáci a dlouhokřidlí. U všech polymorfních lokusů budou zjištěny alelové konstituce u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila a charakterizovány pomocí genetických programů.

2. Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerší na téma diplomové práce.

2. Otestovat primery amplifikující mikrosatelitové lokusy od vybraných druhů z řádu brodiví a potápky na 6 nepříbuzných jedincích čápa bílého, černého a simbila.

3. Charakterizovat polymorfní *cross-species* mikrosatelity nalezené u čápa simbila, které jako polymorfní označily Klára Nevimová (2012) a Eva Novosadová (2012) ve svých bakalářských pracích.

3. Literární přehled

3.1 Řád brodiví

Rozmanitý řád brodiví (Ciconiiformes) zahrnuje střední až velké druhy ptáků, které jsou si navenek značně podobné (Šťastný *et al*., 1998). Charakteristickými rysy tohoto řádu jsou dlouhé nohy uzpůsobené k brodění a chůzi ve vodě, dlouhý krk a dlouhý zobák, který bývá často specializovaný pro lov vodních živočichů (Brown *et al*., 1993). Tato tělesná přizpůsobení jim však nebrání žít i v jiných podmínkách než vodních, jako jsou suché stepi nebo lesy (Šťastný *et al*., 1998).

Všichni brodiví jsou masožraví ptáci hledající potravu převážně ve vodním prostředí, několik málo druhů se živí suchozemskými živočichy, mršinami nebo parazity (Šťastný *et al*., 1998). Obvykle jim chybí vole, mají třídílný žaludek a samci mohou mít rudimentární penis (Gaisler, 1994). V opeření se často vyskytují holá kožovitá místa nebo různé výrůstky. Častá jsou také dlouhá ozdobná pera, která jim vyrůstají na hlavě a krku, zejména v týlu. U brodivých není typický pohlavní dimorfismus. Zbarvení obou pohlaví je zpravidla stejné, jen samice bývají menší než samci a mohou mít méně ozdobných per (Šťastný *et al*., 1998). Většinou jsou to výborní letci, překonávající velké vzdálenosti. Při plachtění využívají proudy, vznikající oteplováním vzduchu nad pevninou (statické plachtění). Volavky za letu drží krk v esovitém zakřivení, kdežto čápi a ibisi létají s krkem nataženým (Gaisler, 1994; Burnie *et al*., 2008). Hlasové ústrojí je u několika skupin více či méně zakrnělé. Pokud jsou hlasové projevy přítomny, tak bývají výrazné. Pokud nejsou, ptáci nedostatek hlasu doplňují nebo nahrazují jinými zvukovými signály jako klapáním zobáku (Hudec *et al*., 1994). Velmi typická je trvalá zvuková kulisa na hnízdní kolonii (Šťastný *et al*., 1998).

Sociální chování je u této skupiny rozmanité. Některé druhy žijí po celý rok individuálně a ve stálých párech, jiné tvoří hnízdní kolonie o stech až tisících párech a mnohdy smíšené i s druhy z jiných řádů (Šťastný *et al*., 1998). Většina koloniálních druhů hnízdí na stromech nebo v mangrovových porostech a kladou 4 až 6 vajec. Mláďata jsou nidikolní, v hnízdě zůstávají několik týdnů a starají se o ně oba rodiče (Gaisler, 1994; Burnie *et al*., 2008). Pohlavní dospělosti dosahují mezi 1. až 5. rokem života. Celý řád je kosmopolitní, s výjimkou polárních oblastí, je rozšířen po celé Zemi,

kdy těžištěm výskytu jsou tropické oblasti. Některé druhy patří ke kriticky ohroženým, ale díky důsledné ochraně se jejich počty zvyšují (Šťastný *et al*., 1998).

Řád brodiví zahrnuje 115 druhů v 5 čeledích. U nás hnízdí 10 druhů, které spadají do dvou čeledí, ale běžně je v ČR zjištěno hnízdění pouze 4 druhů (Šťastný *et al*., 1998).

Taxonomické rozdělení řádu brodiví do 5 čeledí podle del Hoya (1992):

Řád: Ciconiiformes (brodiví)

Čeleď: Ardeidae (volavkovití)

Čeleď: Scopidae (kladivoušovití)

Čeleď: Balaenicipitidae (člunozobcovití)

Čeleď: Threskiornithidae (ibisovití)

Čeleď: Ciconiidae (čápovití)

3.1.1 Čeleď čápovití

Čeleď čápovití (Ciconiidae) je velmi dobře definovaná skupina, která byla velmi výrazná v období třetihor a nejstarší čáp zřejmě pochází z doby svrchního eocénu. Podle fosilních nálezů asi 30 druhů, došlo k největší radiaci čeledi v nadcházejícím oligocénu (del Hoyo *et al*., 1992). Nyní je 19 recentních druhů v 6 rodech řazeno do 3 tribů. Tribus Mycteriini zahrnuje rody *Mycteria* (nesyt) a *Anastomus* (zejozob), tribus Ciconiini (typičtí čápi) obsahuje jeden rod *Ciconia* (čáp) a tribus Leptoptilini (obrovští čápi) zahrnuje zbývající tři rody *Ephippiorhynchus* (čáp), *Leptoptilos* (marabu) a *Jabiru* (jabiru) (Brown *et al*., 1993).

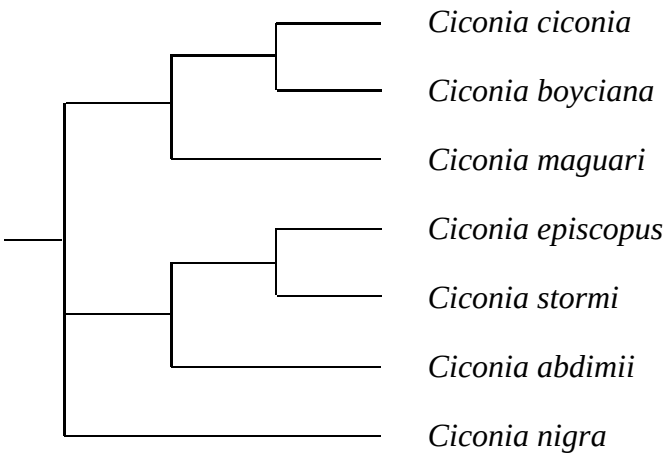
Čápovití jsou středně velcí ptáci typičtí svým dlouhým krkem, zobákem a nohama. Ačkoliv mají mohutnější stavbu těla než jejich příbuzní volavky, jsou si strukturně podobní. Největší členové čeledi čápovití se zároveň řadí mezi největší létavé ptáky (del Hoyo *et al*., 1992). Většina druhů je zbarvena černo-bíle, obě pohlaví stejně, kdy samice jsou zpravidla menší (Šťastný *et al*., 1998). Čápi jsou téměř

kosmopolitní a většina z nich odlétá přezimovat do Asie nebo Afriky. Dobře se přizpůsobují okolním podmínkám a obvykle dávají přednost blízkosti vody, někteří jsou zcela závislí na přítomnosti vodního prostředí (del Hoyo *et al*., 1992).

3.1.2 Rod čáp

Původně rod čáp (*Ciconia*) zahrnoval pouze dva druhy a to čápa bílého (*Ciconia ciconia*) a čápa černého (*Ciconia nigra*) (Boles, 2005). Kahl (1972) ve své práci rozšířil rod *Ciconia* o další tři druhy čápa simbila (*Ciconia abdimii*), čápa jihoamerického (*Ciconia maguari*) a čápa bělokrkého (*Ciconia episcopus*). V dnešní době se ale uvádí celkem 7 druhů tohoto rodu, jejichž vztahy popisuje obrázek 1. Pomocí molekulárních metod, bylo zjištěno, že čáp orientální (*Ciconia boyciana*), který byl původně označen jako poddruh čápa bílého, je samostatný druh. To samé platí i pro čápa pestrého (*Ciconia stormi*), který byl zase považován za poddruh čápa bělokrkého. V této práci bylo také zjištěno, že čáp černý je nejpůvodnější druh tohoto rodu (Slikas, 1997). V České republice žijí pouze dva druhy, čáp bílý a čáp černý, což jsou zároveň nejvíce fylogeneticky vzdálené druhy tohoto rodu.

Obrázek 1: Fylogenetické vztahy v rámci rodu *Ciconia.*



3.1.2.1 Čáp bílý

Čáp bílý patří mezi nejpopulárnější divoce žijící evropské ptáky (Gaisler *et* Zima, 2007). Je to velký pták s dlouhým krkem a nohama. Tělo má bílé s černými letkami, červeným zobákem a nohama, jak je vidět na obrázku 2. Je němý, ale hlasový projev nahrazuje klapáním zobáku, zvlášť hlasitým při setkání partnerů na hnízdě (Svensson *et* Grant, 2004).

Obrázek 2: Čáp bílý zachycený u Hradce Králové (Copyright © Václav John).

Čáp bílý je stěhovavý pták. V Palearktické oblasti žije na otevřených prostranstvích, často, ale ne nutně u vodních toků. Mohutná hnízda si staví z klacíků na stromech a ve městech využívá rovných ploch, často se jeho hnízda nacházejí na střechách nebo komínech (Svensson *et* Grant, 2004). Každoročně se vrací na stejné místo, samec obyčejně přilétá dříve, aby hnízdo opravil. Pokud se jeden z páru nevrátí, opatří si osamělý pták rychle nového partnera (Burnie *et al*., 2008). Začátek migrace nastává obvykle v září a říjnu, zpět se vrací hlavně v březnu a dubnu (Brown *et al*., 1993). Jeho zimoviště se nacházejí převážně ve střední a jižní Africe, kde obydluje stepi, savany, bažiny, zatopené louky, laguny a jezera. (del Hoyo *et al*., 1992; Šťastný *et al*., 1998). Do Afriky přilétá přes Gibraltar nebo Suez, jenom velmi zřídka přelétá přes Středozemní moře. Migruje vždy v početných hejnech, která se na místě rozdělí do menších skupin. Pro překonávání velkých vzdáleností se pohybuje pomocí plachtění a využívá stoupavé termické proudy nad pevninou (Brown *et al*., 1993).

Jeho potrava je rozmanitá, i když je zcela živočišného původu. Loví malé savce jako myši, velký hmyz např. sarančata, malé a mladé obojživelníky, převážně žáby, dále hady, ještěrky, ryby, červy apod. (del Hoyo *et al*., 1992). V Africe následuje hlavně hejna přemnožených sarančat stěhovavých (Burnie *et al*., 2008). Čáp bílý hnízdní obvykle koloniálně, kdy hnízda jsou blízko u sebe. Snůšku tvoří většinou 4 vejce, která se líhnou za 33 dní. Mláďata jsou bílá a mají černý zobák. Sexuální dospělosti dosahují ve věku asi 4 let (del Hoyo *et al*., 1992). Volně žijící čápi bílí se mohou dožívat až 33 let, v zajetí se nejstarší čáp dožil věku 48 let (Šťastný *et al*., 1998).

V západní a severní Evropě je vážně ohrožen, patrně v důsledku chemického znečištění prostředí, drátů vysokého napětí a odvodňování luk. V České republice jsou jeho počty nyní stabilní (Gaisler et Zima, 2007). Čáp bílý spolu s čápem černým byli zvoleni ptáky roku 2014 (Beran *et al*., 2014).

3.1.2.2 Čáp černý

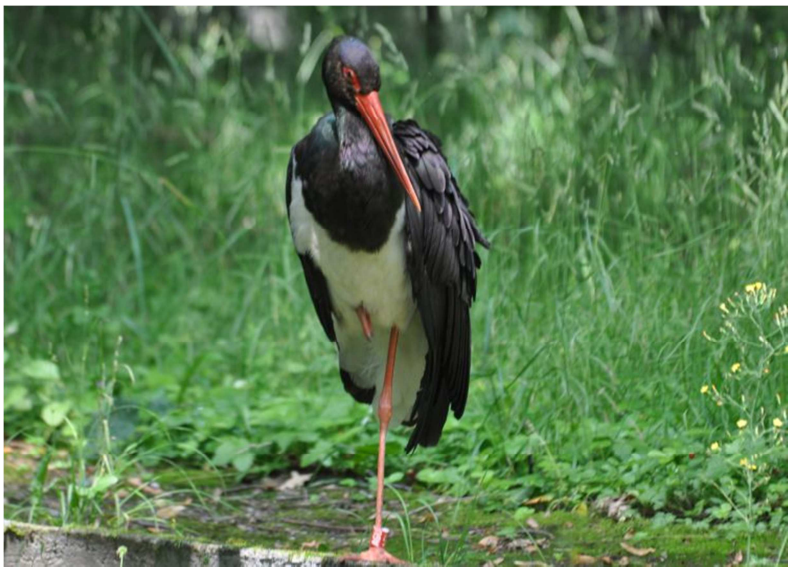
Čáp černý je menší než čáp bílý, kterému se tělem podobá (viz obrázek 3). Zblízka ho lze snadno odlišit podle černé hlavy, krku, hrudi a hřbetu s kovovým leskem do zelena nebo fialova. Za letu jsou rozdíly méně patrné, protože má ze spodní strany křídel bílé trojúhelníkové skvrny. Dlouhé nohy a zobák má červené. Slyšet je málokdy, klapání zobákem je tiché a velmi vzácné (Svensson *et* Grant, 2004).

Čáp černý obývá otevřené klidné lesy, okolí říčních toků, bažiny a mokřady. Naopak se vyhýbá uzavřeným lesům a velkým vodním plochám (del Hoyo *et al*., 1992). Na rozdíl od čápa bílého je velmi plachý a straní se kontaktu s lidskými obydlími. (Svensson *et* Grant, 2004). Žije v malých skupinách, čítajících kolem 30 jedinců nebo je zcela solitérní. Patří mezi stěhovavé ptáky, ale výjimku tvoří stálé populace ve Španělsku. Palearktické populace létají do Afriky přes Suez a Gibraltar, ale také přes Středozemní moře oproti čápu bílému, protože nejsou tak závislí na stoupavých termických proudech (Brown *et al*., 1993). Několik čápů z Křivoklátska, označených miniaturními vysílačkami, bylo hlavními aktéry akce jménem Africká odysea, při které se sledovala jejich migrace do střední Afriky (Šťastný *et al*., 1998).

Živí se hlavně rybami, které chytá v mělké vodě, rychlým bodavým pohybem zobáku. Dále obojživelníky, hady, malými savci a ptáky. Je mnohem méně závislý na hejnech sarančat a kobylek než čáp bílý nebo simbil (Brown *et al*., 1993). Čáp černý

hnízdí v jednotlivých párech uvnitř lesů (Šťastný *et al*., 1998). Obvykle má hnízdo v koruně stromu, ve Španělsku a v severní Africe si hnízda často staví na útesech. Pokud to podmínky umožňují, jsou hnízda jednotlivých párů od sebe vzdálena minimálně 8 km. Budují je pomocí klacíků a obydlují každý rok (Brown *et al*., 1993). Obvykle snáší 3-4 vejce, která se líhnou asi za 35 dní. Sexuální dospělosti nedosahují před 3. rokem života. Ve volné přírodě se dožívají až 18 let, v zajetí se nejstarší čáp černý dožil 31 let (del Hoyo *et al*., 1992).

Obrázek 3: Čáp černý chovaný v ZOO Zlín (Copyright © Lubomír Klátil).



V Evropě se jeho počty silně snížily v 19. století a ze západní Evropy téměř vymizel. Po roce 1930 však jeho početnost začala postupně růst a jeho území se začalo rozšiřovat směrem na západ (Šťastný *et al*., 1998).

3.1.2.3 Čáp simbil

Čáp simbil je nejmenší druh čápa, který se vyskytuje pouze v Africe. Hlava, krk a vrchní části těla jsou černé se zeleným a fialovým odleskem. Náprsenku, břicho, spodní stranu ocasu a část spodní strany křídel má naopak bílé. Jeho zobák je světle zelený s červenou špičkou a obličej je šedo-modrý s červeným flíčkem u oka směrem k zobáku. Zelené nohy jsou v místech kloubů a na prstech také červené (Brown *et al*., 1993). Vzhled dospělého jedince je zachycen na obrázku 4.

Obrázek 4: Čáp simbil zachycený v ZOO Praha (Copyright © Zdeněk Chalupa).

Simbil obývá otevřené pastviny, obdělávané půdy, často v blízkosti vody, ale není výjimkou, že žije ve velmi suchých oblastech a polopouštích (del Hoyo *et al*., 1992). Žije ve velkých skupinách, zřídka je viděn ve skupině čítající pod 10 jedinců, často v blízkosti čápů bílých. Stejně jako čáp bílý se nestraní společnosti lidí (Brown *et al*., 1993). Patří mezi tažné ptáky, ale z Afriky se nevzdaluje, migruje vždy na sever nebo na jih od rovníku. Stěhuje se v obrovských hejnech, která čítají až 10 000 jedinců. Hnízdit začíná v květnu na začátku období dešťů, v severní Africe, pak přelétá do Afriky jižní. Je to koloniální druh, hnízda si staví na útesech nebo v korunách stromů, často s jinými druhy ptáků (del Hoyo *et al*., 1992).

Čáp simbil se živí zejména sarančaty, kobylkami, cvrčky a jiným velkým hmyzem. Spolu s čápem bílým je závislý na hejnech kobylek a sarančat. Dále se také živí žábami, ještěrkami, myšmi a malými rybami (Brown *et al*., 1993). Většinou snáší 2-3 vejce, ale není výjimkou pouze jedno. V zajetí se mláďata líhnou za 30 dní a nejstarší čáp simbil se v zajetí dožil 21 let. Jeho populace nejsou globálně ohroženy (del Hoyo *et al*., 1992).

3.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující sekvenční motivy, kde základní repetitivní jednotka nepřesahuje délku 6 párů bází (Anmarkrud *et al.,* 2008). Spolu s minisatelity a satelity představují velkou rodinu, zvanou jako tandemová repetitivní DNA (Bennett, 2000). Nejběžnější jsou mono-, di- a tri-nukleotidové motivy, přičemž velikost celé repetice nepřesahuje délku 100 bp (Tautz, 1989). Jsou všudypřítomné, nacházejí se jak v eukaryotických tak v prokaryotických genomech, ale také v nejmenších bakteriálních chromozomech a to jak v kódujících tak nekódujících oblastech. Mikrosatelity, jinak také jednoduché repetitivní sekvence, jsou mimo jiné často spojovány s lidskými chorobami. Zvláště tri-nukleotidové sekvence hrají významnou roli v řadě neurodegenerativních onemocnění jako je Huntingtonova chorea, myotonická dystrofie a další (Tóth *et al.,* 2000). Patří mezi nejvíce variabilní sekvence DNA a na rozdíl od unikátních sekvencí, je jejich polymorfismus založen na různých počtech opakujících se repetitivních jednotek, tudíž na délce mikrosatelitu, nežli na jeho primární sekvenci. Kromě toho je genetická variabilita v mikrosatelitových lokusech dána také vysokou heterozygotností a přítomností velkého počtu alel (Ellegren, 2004).

Mikrosatelity patří mezi nejvyužívanější molekulární markery a nacházejí uplatnění v mnoha oblastech genetiky včetně populačních studií, analýze paternity, konzervační genetice a v dalších. Velký rozsah jejich využití je dán faktem, že jsou kodominantní, vysoce polymorfní a jejich studium je založeno na PCR, která je dobře reprodukovatelná (Oliveira *et al.,* 2006). Molekulární mechanismus vzniku variability mikrosatelitových lokusů není zcela objasněn, ale za hlavní zdroj se považuje sklouznutí DNA polymerázy během replikace. Tento proces má za následek získání nebo ztrátu jedné nebo více repetitivních jednotek (Anmarkrud *et al.,* 2008). Sklouznutím polymerázy vzniká na templátovém nebo nově syntetizovaném vlákně DNA tzv. smyčka. Na templátovém vlákně má za následek zkrácení délky repetice, naopak přítomností na syntetizovaném vlákně, vzniká repetice delší (Bennett, 2000).

Hledání nových specifických mikrosatelitových primerů je velmi drahé, proto se pro studium mikrosatelitů využívá primerů, které byly navrženy pro jiné druhy, jedná se o tzv. *cross-species* PCR amplifikaci (Galbusera, 2000). Úspěšnost amplifikace přímo koreluje s fylogenetickou vzdáleností mezi zdrojovým a zkoumaným druhem.

Například primery původně navržené pro některé primáty, byly použity pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů u člověka (Primmer *et al*., 1996).

Ačkoli se mikrosatelity jeví jako výborné markery, mohou nastat problémy při analýze výsledků. Takovým problémem může být přítomnost nulových alel, které nejsou amplifikovány pomocí PCR a tedy ani detekovány pomocí gelové elektroforézy. Hlavní příčinou vzniku nulové alely je mutace v přiléhající oblasti k mikrosatelitu, kde nasedá primer. Mutace může postihnout jednu nebo obě sekvence pro nasednutí primerů a tím pádem nedojde k amplifikaci (Dakin *et* Avise, 2004). Při PCR amplifikaci mikrosatelitů mohou vznikat tzv. *sttuter bandy,* které mohou znesnadnit hodnocení výsledků (Walsh *et al*., 1996). Ty jsou o jednu nebo dvě repetitivní jednotky kratší než hlavní produkt a jsou způsobeny sklouznutím *Taq* DNA polymerázy (Daniels *et al*., 1998). Jev, při kterém vznikají stejně velké alely, které ale nejsou odvozené z jedné ancestrální alely, se nazývá homoplazie alel. Hlavní příčinou jejich vzniku jsou mutace (Estoup *et al*., 2002).

3.2.1 Mikrosatelity u čápa bílého

Shephard *et al.,* (2009) jako jediní publikovali článek, týkající se izolace a charakterizace mikrosatelitových lokusů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). DNA pro tvorbu genomické knihovny, byla extrahována z krve jednoho jedince a analýzu provedli u 30 jedinců. Nalezli celkem 7 nových mikrosatelitových markerů, Cc01-Cc07, s počtem alel 2-10 na lokus. Také použili páry primerů nalezené u nesyta amerického (*Mycteria americana*) (Tomasulo-Seccomandi *et al.,* 2003) pro *cross-species* PCR amplifikaci u čápa bílého a nalezli tak u něj 6 polymorfních lokusů s počtem alel 2-3 na lokus.

S cílem nalézt nové polymorfní mikrosatelity pro čápa bílého, s použitím *cross-species* primerů, od blízce příbuzných druhů, se zabývala ve své bakalářské práci také Obručová (2009). Celkově touto metodou testovala 167 párů primerů, které již dříve daly polymorfní produkty u druhů z řádu brodiví (Ciconiiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), veslonozí (Pelecaniformes), vrubozobí (Anseriformes), tučňáci (Sphenisciformes) a sudokopytnící (Artiodactyla). K testování používala DNA extrahovanou z krve pomocí fenol-chloroformové metody, získanou od 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého. Dohromady objevila 20 polymorfních

mikrosatelitových lokusů, ale u 2 párů se jednalo o ortologní mikrosatelity (Eru07 a Eru09, Wsμ17 a Wsμ18). Výsledkem byl tedy zisk 18 nezávislých polymorfních mikrosatelitů.

Burianová (2011) ve své diplomové práci popsala hledání a analýzu nových mikrosatelitových markerů s použitím *cross-species* primerů pro determinaci paternity u čápa bílého. K dispozici měla 198 párů primerů, díky kterým nalezla 13 polymorfních lokusů a také retestovala několik mikrosatelitů, vyhodnocených Obručovou (2009) jako monomorfní, díky čemuž nalezla 1 polymorfní mikrosatelitový lokus. Páry primerů byly původně navrženy na mikrosatelity jiných ptačích druhů z 5 řádů a to: brodivých, dlouhokřídlých (Charadriiformes), plameňáků a veslonohých. Dalším jejím úkolem byla genotypizace nově nalezených lokusů a také polymorfních mikrosatelitů nalezených Obručovou (2009). Pro zjištění spolehlivosti polymorfních mikrosatelitů jako genetických markerů pro budoucí studium, použila statistický program Cervus 3.0.3. A pro zjištění případné vazby mezi lokusy a vazby na pohlaví využila program Genopop 4.0.10. Výsledkem byl mimo jiné nález silné fyzické vazby mezi 3 mikrosatelitovými lokusy a byly nalezeny 4 lokusy vázané na pohlaví.

3.2.2 *Cross-species* mikrosatelity u čápa černého

Navrátilová (2009) měla za úkol nalézt polymorfní mikrosatelitové markery u čápa černého. Charakterizaci prováděla na 6 nepříbuzných jedincích čápa černého, kterým byla odebrána krev a následně izolována DNA pomocí fenol-chloroformové metody. K amplifikaci používala 174 párů primerů, původně navržených pro jiné druhy z řádu brodiví, veslonozí, vrubozobí, potápky, tučňáci a sudokopytníci. Tři polymorfní lokusy detekovala pomocí párů primerů od veslonohých, po jednom od vrubozobých a tučňáků a 16 pomocí primerů od brodivých, zbylých 153 lokusů bylo monomorfních. Celkem bylo objeveno 21 polymorfních produktů a i v této bakalářské práci byl podpořen fakt, že páry primerů Wsμ17 a Wsμ18 jsou ortologní, tudíž amplifikují stejné lokusy. Výsledkem bylo 20 nezávislých polymorfních mikrosatelitů.

Další práce, která se zabývala analýzou a charakteristikou polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého, byla diplomová práce Cahlíkové (2011). Cílem bylo provést *cross-species* PCR amplifikaci s 218 páry primerů odvozenými od druhů z řádů brodiví, dlouhokřídlí, plameňáci, potáplice

(Gaviiformes) a veslonozí. Dalším úkolem bylo také retestování monomorfních mikrosatelitů nalezených u čápa černého v práci Navrátilové (2009). Celkem získala 12 polymorfních lokusů, které spolu s polymorfními lokusy z práce Navrátilové (2009) genotypovala na 24 jedincích čápa černého. Jejich charakteristiku provedla pomocí statistických programů Cervus 3.0.3 a Genepop 4.0.10 a nalezla mimo jiné 5 mikrosatelitů, které byly vázány na pohlaví a tři z nich mezi sebou vykazovaly silnou vazbu.

3.2.3 *Cross-species* mikrosatelity u čápa simbila

Cílem bakalářské práce Nevimové (2012) bylo nalézt polymorfní mikrosatelity u čápa simbila s použitím *cross-species* párů primerů původně navržených pro ptáky z řádů brodivých, potápek, potáplic, dlouhokřídlých a tučňáků, které testovala na 6 jedincích. K dispozici měla celkem 187 párů primerů, které nejprve shodně testovala při teplotě *annealingu* 50 °C a elektroforetické separaci 1,5 hod. Objevila 26 polymorfních markerů, s počtem alel 2-6. U jednoho mikrosatelitového lokusu nalezla nulovou alelu a nejvíce polymorfních produktů poskytly primery původně navržené pro nesyta lesního a čápa bílého.

Novosadová (2012) se také zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u čápa simbila, ale používala páry primerů primárně navržených od ptáků z řádů veslonozí a plameňáci. Ve své bakalářské práci testovala 194 párů primerů pomocí *cross-species* PCR amplifikace na 6 nepříbuzných jedincích. Základní teplota annealingu byla 50 °C a délka separace 1,5 hodiny, dále tyto hodnoty měnila pro zisk optimálních podmínek k hodnocení výsledků. Z celkového počtu 194 párů primerů, 24 poskytlo polymorfní produkty, z toho 14 párů pocházelo od druhů z řádu veslonozí a 10 od plameňáků.

Tabulka 1: Počet nalezených polymorfních mikrosatelitů u čápa simbila v bakalářské práci Nevimová (2012). Dále tabulka uvádí zdrojový druh, pro který byl původně pár primerů navržen a jeho zařazení do čeledi a řádu.

Řád	Čeleď	Zdrojový druh	Počet polymorfních mikrosatelitů
Brodiví (Ciconiiformes)	Čápovití (Ciconiidae)	Čáp bílý (*Ciconia ciconia*)	4
		Čáp východní (*Ciconia boyciana*)	3
		Nesyt lesní (*Mycteria americana*)	7
	Ibisovití (Threskiornithidae)	Kolpík růžový (*Ajaia ajaja*)	1
		Kolpík malý (*Platalea minor*)	2
		Ibis japonský (*Nipponia nippon*)	2
	Volavkovití (Ardeidae)	Volavka žlutozobá (*Egretta eulophotes*)	1
		Volavka červenavá (*Egretta rufescens*)	2
		Kvakoš noční (*Nycticorax nycticorax*)	3
Dlouhokřídlí (Charadriiformes)	Alkovití (Alcidae)	Alkounek drobný (*Aethia pygmaea*)	1

Tabulka 2: Počet nalezených polymorfních mikrosatelitů u čápa simbila v bakalářské práci Novosadová (2012). Dále tabulka uvádí zdrojový druh, pro který byl původně pár primerů navržen a jeho zařazení do čeledi a řádu.

Řád	Čeleď	Zdrojový druh	Počet polymorfních mikrosatelitů
Plameňáci (Phoenicopteri-formes)	Plameňákovití (Phoenicopteridae)	Plameňák růžový (*Phoenicopterus rosesus*)	9
		Plameňák karibský (*Phoenicopterus ruber*)	1
Veslonozí (Pelecaniformes)	Faetonovití (Phaethontidae)	Faeton žlutozobý (*Phaethon lepturus*)	1
	Fregatkovití (Fregatidae)	Fregatka obecná (*Fregata minor*)	4
	Pelikánovití (Pelecanidae)	Pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*)	1

Tabulka 2: Pokračování.

Řád	Čeleď	Zdrojový druh	Počet polymorfních mikrosatelitů
Veslonozí (Pelecaniformes)	Pelikánovití (Pelecanidae)	Pelikán severoamerický (*Pelecanus eythrorhynchos*)	1
	Kormoránovití (Phalacrocoracidae)	Kormorán ušatý (*Phalacrocorax auritus*)	1
		Kormorán velký (*Phalacrocorax aristotelis*)	1
	Terejovití (Sulidae)	Terej modronohý (*Sula nebouxii*)	3
		Terej červenonohý (*Sula sula*)	1
		Terej guánový (*Sula variegata*)	1

3.2.4 Mikrosatelitové lokusy nalezené u druhů z řádu brodiví

V rámci řádu brodiví bylo vydáno několik prací, popisujících izolaci a charakteristiku mikrosatelitových lokusů. Publikovány byly mikrosatelity nalezené u druhů z čeledi čápovití (Ciconiidae), ibisovití (Threskiornithidae) a volavkovití (Ardeidae).

V případě čeledi čápovití byly vydány 4 vědecké články, jejichž autoři se zabývali celkem 3 druhy: nesytem americkým (*Mycteria americana*), čápem bílým (*Ciconia ciconia*) a čápem východním (*Ciconia boyciana*), u kterých hledali mikrosatelitové lokusy.

Van Den Bussche *et al*. (1999) nalezli 4 polymorfní mikrosatelity u nesyta amerického. Vzorky krve byly odebrány 136 jedincům z 9 různých hnízdních kolonií ve státech Florida a Georgie a k vlastní analýze bylo nakonec použito 67 vzorků od jedinců ze 7 různých kolonií. Polymorfní lokusy WS1, WS2, WS4 a WS6 posloužily ke studiu genetické diverzity mezi hnízdními koloniemi. Tomasulo-Seccomandi *et al*. (2003) popsali izolaci 11 polymorfních mikrosatelitů (WSμ03-Wsμ24) také u nesyta amerického. Z 24 testovaných párů primerů, se ukázalo 11 jako polymorfních a bylo

jimi genotypováno celkem 31 jedinců. Tři lokusy Wsμ08, Wsμ14 a Wsμ20 nebyly v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. U lokusů Wsμ17 a Wsμ18 nalezli vazbu. Počet alel se pohyboval v rozmezí 2 až 4 alely na lokus a pozorovaná heterozygotnost byla v rozmezí 0,000-0,727. Polymorfní mikrosatelity měly posloužit ke studiu genetické variability amerických a brazilských populací.

Již zmínění autoři Shephard *et al*. (2009) objevili 7 mikrosatelitových markerů (Cc01-Cc07) u čápa bílého. DNA pro tvorbu genomické knihovny, byla extrahována z krve jednoho jedince. Analýzu provedli u 30 jedinců a objevili 2-10 alel na lokus s očekávanou heterozygotností 0,13-0,84. Nezjistili odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy u žádného lokusu. Polymorfní lokusy byly použity pro analýzu paternity.

Dalším studovaným druhem byl čáp východní, kterým se zabývali Wang *et al.* (2011). Tento druh je řazen mezi kriticky ohrožené, nachází se pouze ve východním Rusku a severní Číně. Hlavně díky lidské činnosti se jeho populace rok od roku rapidně snižují, v roce 2001 byly populace odhadovány na 3 tisíce jedinců. Autoři představili 11 mikrosatelitových párů primerů, které navrhli pomocí metody FIASCO (*Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats*). Všechny markery byly využity ke studiu konzervační genetiky čápa východního. Vzorky krve nebo tkáně byly odebrány 23 volně žijícím jedincům, kteří zemřeli přirozenou smrtí a k extrakci DNA byla použita fenol-chloroformová metoda. Počty alel u 11 mikrosatelitů se pohybovaly v rozmezí 2-8 na lokus, pozorovaná a očekávaná heterozygotnost byla 0,000-0,857 a 0,222-0,851. U lokusů Cbo133 a Cbo235 byly objeveny nulové alely a také se odchylovaly od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. U žádných mikrosatelitů nezaznamenali přítomnost vazebné nerovnováhy.

Celkem 5 vědeckých prací se zabývalo hledáním a analýzou mikrosatelitových lokusů u 4 druhů z čeledi ibisovití. Bylo to u druhů ibis japonský (*Nipponia nippon*), ibis rudý (*Eudocimus ruber*), kolpík růžový (*Ajaia ajaja*) a kolpík malý (*Platalea minor*).

Ji *et al*. (2004) nalezli polymorfní mikrosatelity u ibise japonského. Ibis japonský je kriticky ohrožený druh. Současné populace se vyvinuly ze 4 divoce žijících jedinců, nalezených v roce 1981 v Číně. Dříve se hojně vyskytovali v Rusku, Japonsku, Koreji, ale jejich populace byly zdecimovány lovem, masivním odlesňováním, vysušováním mokřadů, chemickým hnojením a používáním pesticidů. S ohledem na jeho dnešní stav, existuje značný zájem o stanovení genetické diverzity a příbuznosti

jedinců tohoto druhu. Autoři článku nalezli 8 polymorfních mikrosatelitů s di- a tri-nukleotidovou základní jednotkou repetice. Očekávaná heterozygotnost se pohybovala v rozmezí 0,01-0,50 a počet alel byl 1-3, což je příkladem efektu hrdla lahve u tohoto druhu. Nově nalezené mikrosatelity použili pro *cross-species* PCR amplifikaci u tří příbuzných jedinců ibise černohlavého (*Threskiornis melanocephalus*). Při úspěšné amplifikaci objevili 5 polymorfních lokusů. He *et al*. (2006) také hledali polymorfní mikrosatelity u ibise japonského. Izolovali 11 nových lokusů, které byly použity pro determinaci genetické diverzity volně žijících populací a populací chovaných v zajetí. 36 vzorků, kterými byla krev, části svalů a peří, získali z 9 divoce žijících jedinců a z 27 jedinců v zajetí. Všech 11 lokusů bylo polymorfních v obou populacích, kdy počet alel byl 2-5 na lokus. Očekávaná heterozygotnost v divoce žijící populaci byla 0,506, u populace v zajetí 0,486 a u 5 alel zjistili odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Jelikož heterozygotnost u obou populací nebyla příliš rozdílná, indikovalo to blízkou genetickou struktury populací.

Pro druh ibis rudý popsali izolaci a charakterizaci polymorfních mikrosatelitovch lokusů Santos *et al*. (2006). Genomickou knihovnu připravili z DNA jednoho jedince a na 17 mikrosatelitových lokusů navrhli primerové páry. Polymorfismus a heterozygotnost otestovali na DNA 45 jedinců, kteří byli odchyceni ve tří různých brazilských populacích. Průměrný počet alel na lokus byl 6, pozorovaná heterozygotnost 0,03-0,92 a očekávaná 0,06-0,92. Pouze jeden mikrosatelit (Eru10) se nacházel v Hardy-Weinbergově rovnováze u všech tří populací.

U dalšího druhu z čeledi ibisovití, kolpíka růžového, bylo popsáno 6 (Ajaja1-Ajaja6) polymorfních mikrosatelitových lokusů (Sawyer *et al*., 2006). V USA se nachází mnoho zoologických zahrad, které chovají kolpíky růžové. Zachování genetické diverzity populací a tím zvýšení genetické fitness potomků je závislé právě na výměně jedinců mezi zoologickými zahradami. Ve svém přirozeném prostředí jsou kolpíci monogamní, ale v zajetí bylo zachyceno mimopárové chování. Cílem studie bylo správně identifikovat genetickou konstituci jedinců a zajistit tak přenos nepříbuzných ptáků mezi zahradami. Autoři analyzovali vzorky z 61 jedinců, které poskytly tři zoologické zahrady a jedna volně žijící populace. Objevili průměrně 6 alel na lokus a očekávaná heterozygotnost byla 59% až 81%. Zjistili, že lokus Aaju4 měl dvě alely a byl vázaný na pohlaví. Menší alela 161 bp byla vázaná na chromozom W a delší alela 200 bp na chromozom Z.

Yeung *et al*. (2009) izolovali 23 mikrosatelitových lokusů u kolpíka malého. Tento pták je zařazen na listinu světově ohrožených druhů a endemicky se vyskytuje pouze ve východní Asii. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 19 a frekvence 5 alel se odchylovala od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Autoři objevili jeden mikrosatelit, PM2-20, který byla pravděpodobně vázán na chromozom Z, protože všichni homozygoti, byly samice. Zbylých 18 vhodných lokusů, bylo použito jako molekulární markery ke studiu konzervační genetiky a *cross-species* PCR amplifikaci u ostatních ptáků z řádu brodiví, kde už autoři neuvedli počty testovaných jedinců ani, zda byly produkty polymorfní.

Poslední čeleď v rámci řádu brodiví, která byla předmětem studia, byla čeleď volavkovití. Celkem bylo publikováno 6 článků, popisující hledání a charakteristiku mikrosatelitů u 5 druhů.

U volavky velké (*Ardea herodias*) popsali hledání nových mikrosatelitových lokusů McGuire *et* Noor (2002). Objevili 60 sekvencí, které obsahovaly mikrosatelity a na 28 z nich navrhli páry primerů. Pro genotypizaci použili vzorky DNA od 40 jedinců volavek velkých. 26 párů primerů poskytlo PCR produkty, kdy 15 z nich bylo polymorfních, 2 byly monomorfní a 9 poskytlo nehodnotitelné produkty. Počet alel u 15 polymorfních lokusů se pohyboval od 2 do 18.

Chang *et al*. (2009) publikovali práci, ve které charakterizovali 11 polymorfních mikrosatelitů nalezených u kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*). Použili genomickou DNA, která byla izolována z krve 32 jedinců. Primery navrhli pomocí metody FIASCO a detekovali celkem 82 alel. Pozorovaná heterozygotnost se pohybovala v rozmezí 0,25-1,00 a očekávaná od 0,51 do 0,88. Mezi lokusy nebyla nalezena žádná vazebná nerovnováha. Těchto 11 mikrosatelitů bylo použito ke *cross-species* PCR amplifikaci u dalších 11 druhů z čeledi volavkovitých. Lokusy nycti26 a nycti62 byly amplifikovány u všech 11 druhů a lokusy nycti22, nycti68 a nycti15 poskytovali amplifikační produkt u 10 druhů**.** Autoři již neuvedli, zdali u testovaných jedinců byly produkty polymorfní.

U volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) Huang *et al*. (2010) objevili 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Tento pták je řazen na červenou listinu ohrožených druhů, genetické markery tak mohou pomoci zodpovědět ekologické a genetické otázky, týkající se jeho záchrany. Vzorky pro genotypizaci představovala DNA 20 jedinců tohoto druhu, odchycených v čínské provincii Fujian. Počet

nalezených alel se pohyboval od 2 do 9, pozorovaná heterozygotnost byla 0,20-0,85 a očekávaná 0,18-0,82. Jeden lokus (Ae25) se odchýlil od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a mezi lokusy nebyla zaznamenána žádná vazba. Tyto lokusy (Ae01-Ae47) byly použity pro *cross-species* PCR amplifikaci u dalších 5 druhů z čeledi volavkovitých. Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace se pohybovala od 77,78 %-100,00 %, ale o polymorfismu se dále autoři nezmiňují. Nejnovější práce se týká objevu 23 mikrosatelitových markerů také u volavky žlutozobé (Dai *et al*., 2013). Autoři k objevení nových mikrosatelitových lokusů použili celogenomové sekvenovaní pomocí metody 454 pyrosekvenování. Nejprve všech 74 nově objevených markerů testovali na 6 jedincích, a poté vyřadili ty, které daly monomorfní produkty nebo nebyly amplifikovány. Zbylých 26 mikrosatelitových markerů testovali na 32 jedincích a nalezli 2-9 alel na lokus, přičemž 3 z nich vyřadili (Ee10, Ee17 a Ee23) z důvodů odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Další druh v rámci čeledi volavkovití, u kterého byly hledány mikrosatelity, byla volavka červenavá (*Egretta rufescens*) (Hill *et* Green 2010). Genomickou DNA získali izolací z krve, která byla odebrána z brachiální žíly 13 jedinců z jedné hnízdní kolonie v Texasu. Počet alel, získaný testováním 31 individuí se pohyboval mezi 2-10. Pozorovaná heterozygotnost byla 0,03-0,90 a očekávaná 0,03-0,88, přičemž dva lokusy nespadaly do Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Er23 a Er41) z nichž jeden lokus obsahoval nulové alely (Er41). Autoři nalezené mikrosatelity chtěli dále využít pro studium genetické struktury napříč druhy a také chtěli najít potencionální rozdíly mezi různě barevnými poddruhy v populacích

Campanini *et al*. (2012) identifikovali 11 polymorfních mikrosatelitů u volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*). DNA byla extrahovaná pomocí fenol-chloroformové metody z krve 2 jedinců volavky rusohlavé, odchycených v Brazílii. Celkově identifikovali na 35 jedincích 28 alel v rozmezí 2-4 na lokus. Všechny lokusy byly v Hardy-Weinbergově rovnováze a nenašli žádné nulové alely. Sedm z jedenácti polymorfních markerů úspěšně testovali na 8 druzích z čeledi volavkovití pomocí *cross-species* PCR amplifikace, ale neposkytují informace o polymorfních produktech. Polymorfní lokusy chtěli autoři využít pro pochopení struktury populací a studium kolonizace amerického kontinentu těmito druhy.

3.2.5 Mikrosatelitové lokusy nalezené u druhů z řádu plameňáci

Řád plameňáci zahrnuje 1 čeleď s názvem plameňákovití (Pelecanidae). V rámci této čeledi byly vydány 4 práce zabývající se hledáním a charakteristikou mikrosatelitů u 2 druhů a to u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*).

První práce, která se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u plameňáka karibského, byla dizertační práce Kapil (2005). Uvedl objev celkem šesti mikrosatelitových lokusů, kdy 4 z nich byly vysoce polymorfní (Pruμ1- Pruμ4) s počtem alel 5-14 a 2 méně polymorfní Pruμ5 a Pruμ6 a počtem alel 2-4. Další dizertační práce, která zkoumala polymorfní mikrosatelity u plameňáka karibského byla od Preston (2005). Popisuje izolaci celkem 7 mikrosatelitových lokusů Pruμ7- Pruμ13. Ve společné publikaci (Kapil *et al*., 2009), charakterizovali 9 polymorfních lokusů Pruμ1- Pruμ9. Z 9 polymorfních lokusů dva tvořily komplexní složené repetice a 7 čisté tri-nukleotidové repetice. Počet alel byl od 3 do 14 a hodnoty pozorované heterozygotnosti 0,12-0,91. Všechny lokusy byly v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou a nezaznamenali žádnou vazbu mezi lokusy.

Zástupcem z řádu plameňáci, u kterého byly izolovány polymorfní mikrosatelity, byl i plameňák růžový (Geraci *et al*., 2010). DNA pro tvorbu genomické knihovny byla extrahována fenol-chloroformovou metodou ze vzorků krve, které získali od 10 mláďat z hnízdní kolonie ve Francii. Pro 60 potencionálních lokusů navrhli páry primerů a testovali je na 22 jedincích. Podařilo se jim objevit 37 polymorfních mikrosatelitů s počtem alel 2 až 33 a z toho jeden lokus, PrD117, byl mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu. Zbylých 36 mikrosatelitů bylo použito pro studium genetické diverzity a struktury populací.

3.2.6 Mikrosatelitové lokusy nalezené u druhů z řádu potápky

Potápkovití (Podicipedidae) jsou jedinou čeledí řádu potápky. Hledáním a charakteristikou mikrosatelitových lokusů se zabýval jeden článek, který hledal mikrosatelity u potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*) a jedna dizertační práce, která popisuje izolaci mikrosatelitů u potápky západní (*Aechmophorus occidentalis*).

První práce, která se týkala mikrosatelitů u potápek byla od Sachs *et* Hughes (1999). Ve své práci charakterizovali 7 mikrosatelitových lokusů u potápky rudokrké, které chtěli využít k evolučním studiím. Všechny nalezené lokusy byly polymorfní s počtem alel 7-18 a heterozygotností 65 %-86 % a byly dále testovány u 5 dalších potápek konkrétně u potápky černokrké (*Podiceps nigricollis*), potápky žlutorohé (*Podiceps auritus*), potápky americké (*Podilymbus podiceps*), potápky západní (*Aechmophorus occidentalis*), potápky Clarkovy (*Aechmophorus clarkii*) a u hybrida potápky západní/Clarkovy (*Aechmophorus occidentalis/clarkii*). U potápky žlutorohé bylo všech 7 mikrosatelitů polymorfních s počtem alel 3-7 u potápky černokrké byly naopak všechny mikrosatelity monomorfní. U zbylých druhů bylo nalezeno od 2 do 4 polymorfních produktů s počty alel 2-5.

Humple (2009) ve své diplomová práci popsala izolaci 11 tetranukleotidových mikrosatelitů u potápky západní. Těchto 11 lokusů otestovala na 16 jedincích potápky západní a potápky Clarkovy. Nalezený počet alel byl v rozmezí 2-10 s průměrným počtem 4,5 alely na lokus. Očekávaná heterozygotnost byla 0,482-0,857 a pozorovaná 0,188-0,875.

3.2.7 Mikrosatelitové lokusy nalezené u druhů z řádu dlouhokřídlí

V rámci řádu dlouhokřídlí se pro amplifikaci u druhů z řádů brodiví, veslonozí a plameňáci používají páry primerů, původně navržené pro alkounka drobného (*Aethia pygmaea*), který spadá do čeledi alkovití (Alcidae).

Dawson *et al*. (2005) objevili 17 mikrosatelitových lokusů u alkounka drobného. Původně navrhli primery pro 23 potencionálních mikrosatelitů a testovali je na 8 nepříbuzných jedincích alkounka. 6 párů primerů neamplifikovalo žádné lokusy, 2 páry daly monomorfní produkt a 15 poskytlo polymorfní produkty. Lokusy Apy01, Apy03, Apy13 a Apy15 byly mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu a počet alel se pohyboval od 1 do 25. Pro amplifikaci u vodních ptáků se používají dva páry primerů, Apy06, protože poskytl polymorfní produkt u faetona žlutozobého (2 alely) a Apy07 protože dal polymorfní produkt u fregatky vznešené (*Fregata magnificens*) (2 alely).

3.2.8 Mikrosatelitové lokusy nalezené u druhů z řádu veslonozí

V současné době jsou popsány nové mikrosatelity u 12 druhů z 5 čeledí řádu veslonohých. Publikovány byly mikrosatelity nalezené u druhů z čeledi faetonovití (Phaetontidae), fregatkovití (Fregatidae), pelikánovití (Pelecanidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae) a terejovití (Sulidae).

Zatím od jediného zástupce čeledi faetonovití, faetona žlutozobého, Humeau *et al.* (2010) izolovali a popsali 11 polymorfních mikrosatelitů**.** Ke konstrukci genomické knihovny použili DNA jednoho jedince, nalezeného mrtvého na ostrově Réunion v Indickém oceánu a genotypizaci provedli na 55 jedincích. Počet alel byl 2 až 38, pozorovaná a očekávaná heterozygotnost byla 0,06-0,91 a 0,06-0,95.

Dearborn *et al.* (2008) publikovali práci, ve které uvedli objev 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů u fregatky obecné, což je zatím jediný takto prostudovaný zástupce čeledi fregatkovití. U tohoto druhu dochází pravidelně k příbuzenskému křížení nejméně v jedné populaci. Bylo zjištěno, že příbuzenské křížení může snižovat funkce imunitního systému. Autoři se rozhodli použít mikrosatelity, ke zjišťování příbuznosti mezi jedinci a hledání souvislosti s imunitním systémem. Vzorky DNA získali pomocí fenol-chloroformové metody z krve od jedné samice a jednoho samce, odchycených na Havaji. Nalezli a navrhli 28 párů primerů, které testovali na 23 jedincích z jedné populace, žijící také na Havaji. Výsledkem bylo, že jeden pár primerů neamplifikoval žádný lokus, jeden poskytl nehodnotitelný produkt, 8 bylo shledáno monomorfními a 18 poskytlo polymorfní produkty. Z 18 polymorfních lokusů, tři: Fmin07, Fmin11 a Fmin16, vykazovaly vysokou homozygotnost, pravděpodobně v důsledku výskytu nulových alel. A jeden pár, Fmin12, vykazoval genetickou nerovnováhu. Pro genetické studie bylo nakonec použitelných 14 mikrosatelitů.

Pelikán severoamerický (*Pelecanus erythrorhynchos)* a bílý (*Pelecanus onocrotalus*) se řadí do čeledi pelikánovití, řádu veslonozí a i u nich byly hledány mikrosatelitové lokusy a publikovány celkem 2 práce.

Hickman *et al*., (2008) objevili 9 mikrosatelitových lokusů u pelikána severoamerického. Tento druh ptáka byl na pokraji vyhubení, ale díky ochraně se jeho populace začaly úspěšně rozrůstat. 25 párů primerů, které navrhli pro izolované mikrosatelitové lokusy, testovali na 23 jedincích. Objevili 9 párů primerů (PeEr01-PeEr09), které daly polymorfní produkty u všech 23 vzorků. Počet alel se pohyboval v rozmezí 2-8.

U pelikána bílého bylo objeveno 10 mikrosatelitových lokusů (De Ponte Machado *et al.*, 2009). K charakterizaci 10 izolovaných lokusů použili DNA ze 46 jedinců. Všechny lokusy byly polymorfní a počet alel se pohyboval od 2 do 19. Pozorovaná heterozygotnost byla 0,261-0,913 a očekávaná 0,232-0,947. Lokusy PEL185 a PEL221 byly mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu a lokusy PEL185 a PEL190 měly pravděpodobně nulové alely. Pomocí identifikovaných polymorfních lokusů, provedli *cross-species* PCR amplifikaci u tří pelikánů: pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), pelikána severoamerického a (*Pelecanus erythrorhynchos*) a pelikána hnědého (*Pelecanus occidentalis*). U pelikána afrického nalezli 4 polymorfní mikrosatelity s 2 alelami na lokus. U pelikána severoamerického 4 polymorfní produkty s počtem alel 2-4 a u pelikána hnědého také 4 polymorfní mikrosatelity s 2-7 alelami na lokus.

Další čeledí, u které byly nalezeny nové mikrosatelity, byla čeleď kormoránovití. V rámci této čeledi bylo zveřejněno 6 článků, které popisují objev nových mikrosatelitových lokusů u 5 druhů kormoránů.

Piertney *et al*. (1998) nalezli 7 vysoce polymorfních lokusů u kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), které byly dále použity ke studiu populační struktury, integrace, izolace a genového toku. Stupeň polymorfismu otestovali na DNA ze 100 nepříbuzných jedinců kormorána velkého z kolonií v Anglii, Skotsku a Nizozemí. Nalezli velký počet alel v rozmezí 9-49. Polymorfní mikrosatelity dále použili ke *cross-species* PCR amplifikaci u kormorána ušatého, chocholatého a modrookého a také na poddruhu kormorána velkého. Všechny páry primerů s výjimkou PcD4, daly polymorfní produkty.

Další práce, která se zabývala izolací mikrosatelitů, tentokrát u kormorána galapážského (*Phalacrocorax harissi*), byla od Duffie *et al.* (2008). Tento druh se vyskytuje endemicky pouze na Galapágách a je to jediný nelétavý druh nejen v rámci rodu kormorán, ale také v rámci mořských ptáků. Jako vzorky pro izolaci

mikrosatelitových lokusů jim posloužila DNA z krve 26 jedinců z ostrova Isabela a DNA z krve 24 jedinců z ostrova Fernandina. Vytvořili 24 párů primerů a díky nim objevili 8 tetra-nukleotidových polymorfních mikrosatelitů (PhB2-PhG12) s počtem alel od 3 do 9.

U kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*) bylo objeveno 24 polymorfních mikrosatelitů (Fike *et al*., 2009). Stavy tohoto druhu se drasticky snižují od poloviny 20. století a to hlavně z důvodů zamoření pesticidy, mikrosatelity poslouží ke studiu genetické variability jejich populací. Ke konstrukci genomické knihovny použili DNA izolovanou z krve dvou jedinců. Identifikovali celkem 51 mikrosatelitových lokusů a navrhli na ně primery. 46 párů primerů bylo dále použito ke skríninku 31 jedinců a 24 shledáno jako polymorfních (COR 01-COR 47). Počet alel se pohyboval od 2 do 13 a nalezli 7 lokusů, které obsahovaly nulové alely. Mercer *et al.* (2010) se také zabývali hledáním nových mikrosatelitů u kormorána ušatého. Navrhli 40 párů primerů a ty otestovali na DNA 60 nepříbuzných jedinců. Jako polymorfní se ukázalo 8 mikrosatelitů (Dcco-01 až Dcco-08) s počtem alel v rozmezí 2-17. Očekávaná heterozygotnost byla 0,05-0,89 a nedetekovali žádný lokus mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu. Nakonec tyto nalezené polymorfní mikrosatelity testovali pomocí *cross-species* PCR amplifikace u kormorána západního (*Phalacrocorax penicillatus*) a kormorána mořského (*Phalacrocorax pelagicus*). Autoři neuvádějí, zda amplifikační produkty byly polymorfní.

Další nalezené mikrosatelity byly u kormorána chocholatého *(Phalacrocorax aristotelis*) (Barlow *et al.*, 2010). Autoři popsali izolaci 5 di-nukleotidových a 5 tetra-nukleotidových mikrosatelitových lokusů, získaných z DNA 20 jedinců, z kolonie v jihovýchodním Skotsku. Ke genotypizaci použili DNA celkem 40 jedinců ze skotské a korsické populace a zjistili tak počet alel pohybující se od 1 do 15. Pozorovaná heterozygotnost u lokusů v Hardy-Weinbergově rovnováze byla 0,00-0,89.

Nejnovější práce se týka izolace a charakterizace mikrosatelitů u kormorána tasmánského (*Phalacrocorax fuscescens*) (Riordan *et al*., 2012). Tento druh se endemicky vyskytuje pouze v jižních oblastech Austrálie. Mikrosatelitové lokusy izolovali z genomické DNA pomocí metody 454 *shotgun* sekvenování. Identifikovali tak 31 mikrosatelitových lokusů a navrhli na ně páry primerů, které testovali na 42 jedincích kormorána tasmánského. 2 lokusy se nepodařilo amplifikovat, 13 bylo monomorfních a 16 polymorfních. Z těchto 16 lokusů bylo 7 vybráno pro charakterizaci. Počet alel se pohyboval od 3 do 8, pozorovaná heterozygotnost byla

0,66 a očekávaná 0,62. 3 lokusy (Pf11, Pf33 a Pf39) byly mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu, jeden lokus (Pf11) byl vázaný na pohlaví a u jednoho lokusu (Pf33) byl zaznamenán výskyt nulových alel.

Poslední čeledí, u které byly popsány nové mikrosatelity, byla čeleď terejovití. Celkem 3 práce popisují objev nových mikrosatelitů u tereje červenonohého (*Sula sula*), guánového (*Sula variegata*) a modronohého (*Sula nebouxii*).

Jako první popsali izolaci a charakterizaci mikrosatelitových lokusů u tereje modronohého Faircloth *et al*. (2009). Tyto mikrosatelity posloužily ke studiu hnízdního parazitismu a mimopárového chování u tereje modronohého. Vzorky pro genotypizaci tvořila DNA 31 jedinců, která byla testovaná pomocí 60 nově navržených párů primerů. Pro optimalizace a testování polymorfismu bylo dále použito 18 párů primerů a z toho se nakonec 11 ukázalo jako polymorfní (Boob-RM2-F07 až Boob-RM4-G03). Počet alel byl 3-22 a žádné lokusy nevykazovaly vazbu, ani se nevychýlily od Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Taylor *et al.* (2010) izolovali 10 mikrosatelitových lokusů také u tereje modronohého a tereje guánového (Sn2A-36 až Sn2B-100). Genomické knihovny byly připraveny zvlášť z DNA, extrahované z krve obou jedinců, kteří byli odchyceni v Peru, a bylo navrženo 20 párů primerů. Ke genotypizaci autorům posloužilo 24 jedinců tereje modronohého a 27 jedinců tereje guánového. Celkem 16 lokusů bylo spolehlivě amplifikováno u tereje modronohého nebo guánového a 10 z nich bylo polymorfních s informativní hodnotou. Tyto primery také použili pro *cross-species* PCR amplifikaci tereje žlutonohého (*Sula leoucogaster*), kde nalezli 7 polymorfních lokusů s počtem alel 3 až 10.

U tereje červenonohého Morris-Pocock *et al.* (2010) popsali 15 mikrosatelitových lokusů (Ss1b-16 až Ss2b-153). Genomickou DNA izolovali z krve 15 mláďat a použili ji k tvorbě 18 párů primerů. Nejprve je testovali na 4 jedincích tereje červenonohého a vyřadili tak jeden monomorfní mikrosatelit. Poté je podruhé testovali, tentokrát na 14 jedincích a 2 lokusy vyhodnotili jako monomorfní a také je vyřadili. Zbylých 15 párů primerů, které poskytovaly polymorfní produkty, testovali na 30 jedincích a charakterizovali je pomocí genetických programů. Počet alel se pohyboval v rozmezí 2-11 na lokus, pozorovaná heterozygotnost 0,10-0,90 a jeden lokus (Ss2b-35) byl mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu.

4. Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

K testování *cross-species* párů primerů a nalezení polymorfních mikrosatelitů byla použita genomická DNA, která byla extrahovaná z krve 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého (*Ciconia ciconia*), čápa černého (*Ciconia nigra*) a čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Pro genotypizaci, již nalezených polymorfních mikrosatelitů v předešlých pracích u čápa simbila, byla použita DNA 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila.

4.2 Izolace genomické DNA

Pro PCR bylo nejprve nutné vyizolovat genomickou DNA z ptačí krve, fenol-chloroformovou metodou. Postup izolace byl převzat podle Maniatis *el al.* (1982) a byl optimalizován pro podmínky Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty UPOL:

- Napipetovat 400 μl roztoku krve v Queen´s pufru (Seutin *et al*., 1991) do 1,5 ml mikrozkumavky.
- Do roztoku připipetovat proteinázu K (10 mg/ml) a směs promíchat překlápěním, poté přidat 100 μl 10% SDS.
- Inkubovat mikrozkumavky v termostatu při 37 °C přes noc.
- Druhý den přidat 350 μl fenolu a 350 μl chloroformu a mikrozkumavky zvortexovat a zcentrifugovat (5000 g/2 min). Po centrifugaci odebrat vrchní fázi do nové mikrozkumavky.
- K odebranému roztoku s DNA přidat 700 μl chloroformu a mikrozkumavky zvortexovat a zcentrifugovat. Po centrifugaci vrchní fázi opět odebrat do nové mikrozkumavky. Tento krok zopakovat.
- K odebranému roztoku přidat 180 μl vychlazeného octanu sodného (3 mol/l) a objem doplnit vychlazeným 96% etanolem. Obsah mikrozkumavek překlápěním promíchat a poté uložit na 2 hodiny do -20 °C.
- Po uplynutí doby mikrozkumavky centrifugovat 30 minut při 13000 g/min.

- Etanol slít, aby nedošlo k vylití sraženiny DNA a přidat 1 ml vychlazeného 70% etanolu.
- Mikrozkumavky opět centrifugovat tentokrát 10 minut při 13000 g/min.
- Etanol slít, tak aby nedošlo k vylití sraženiny DNA a obsah mikrozkumavky vysušit v termobloku.
- K vysušené DNA připipetovat 500 μl TE pufru.
- Mikrozkumavky umístit přes noc do termostatu při 40 °C a jejich obsah překlápěním rozpustit.
- Nakonec stanovit koncentraci DNA na nanodropu a poté roztok DNA zmrazit v -20 °C. Část obsahu mikrozkumavek odebrat a zředit deionizovanou vodou na koncentraci 10-50 μg/ml pro PCR a uchovat v lednici.

4.3 Mikrosatelity amplifikované u čápa bílého, čápa černého a čápa simbila

Prvním úkolem bylo pomocí *cross-species* PCR amplifikace nalézt polymorfní mikrosatelity u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého, čápa černého a čápa simbila. Genomická DNA čápa bílého a čápa černého byla amplifikována pomocí 31 párů primerů, které byly původně navrženy pro čápa východního (*Ciconia boyciana*) a volavku rusohlavou (*Bubulcus ibis*) z řádu brodiví (Ciconiiformes) a pro potápku západní (*Aechmophorus occidentalis*) z řádu potápky (Podicipediformes). Genomická DNA čápa simbila byla amplifikována 22 páry primerů, které byly původně navrženy pro volavku rusohlavou a potápku západní. Všechny testované lokusy jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Přehled nově testovaných mikrosatelitů u čápa bílého, čápa černého a čápa simbila. V tabulce je dále uveden zdrojový druh, jeho zařazení do řádu a autor publikace.

Řád	Zdrojový druh	Testované lokusy	Autor
Brodiví (Ciconiiformes)	Čáp východní (*Ciconia boyciana*)	Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168, Cbo235	Wang *et al*., 2011
	Volavka rusohlavá (*Bubulcus ibis*)	Bi01, Bi08, Bi13, Bi15, Bi18, Bi20, Bi22, Bi26, Bi28, Bi29, Bi30	Campanini *et al.*, 2012
Potápky (Podicipediformes)	Potápka západní (*Aechmophorus occidentalis*)	B8, B11, B102, B112b, B113, C5, E202, G118, G206, G209, G215	Humple, 2009

Pozn.: U čápa simbila byly testovány pouze páry primerů od volavky rusohlavé a potápky západní.

Dalším úkolem bylo provést genotypizaci 10 jedinců čápa simbila pomocí polymorfních *cross-species* párů primerů, které byly již dříve nalezeny v bakalářských pracích Nevimové (2012) a Novosadové (2012). Ke genotypizaci bylo použito 50 párů primerů, které byly původně navrženy pro druhy z řádu brodiví, veslonozí (Pelecaniformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), dlouhokřídlí (Charadriiformes) a potápky. V bakalářské práci Nevimové (2012) bylo nalezeno 25 polymorfních mikrosatelitů pomocí párů primerů od druhů z řádu brodiví a dlouhokřídlí. V rámci řádu brodiví to bylo konkrétně od čápa bílého, čápa východního, nesyta lesního (*Mycteria americana*), kolpíka růžového, kolpíka malého (*Platalea minor*), ibise japonského (*Nipponia nippon*), volavku žlutozobou (*Egretta eulophotes*), volavku červenavou (*Egretta rufescens*) a kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*) a z řádu dlouhokřídlí od alkounka drobného (*Aethia pygmaea*). Další bakalářská práce, která se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u čápa simbila, byla od Novosadové (2012). Nalezla také 25 polymorfních mikrosatelitů díky párům primerům, které byly původně navrženy pro plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) a plameňáka karibského

(*Phoenicopterus ruber*) z řádu plameňáci a pro faetona žlutozobého (*Phaeton lepturus*), fregatku obecnou (*Fregata minor*), pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), kormorána velkého (*Phalacrocorax aristoelis*), tereje modronohého (*Sula nebouxii*), tereje červenonohého (*Sula sula*) a tereje guánového (*Sula variegata*) z řádu veslonozí. Všechny genotypované lokusy jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5.

Tabulka 4: Přehled polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa simbila, které byly nalezeny v bakalářské práci Nevimové (2012). V tabulce je dále uveden zdrojový druh, jeho zařazení do řádu a autor publikace.

Řád	Zdrojový druh	Polymorfní mikrosatelity	Autor
Brodiví (Ciconiiformes)	Čáp bílý (*Ciconia ciconia*)	Cc02, Cc03, Cc04	Shephard *et al*., 2009
		CC1	Segelbacher-osobní sdělení
	Čáp východní (*Ciconia boyciana*)	Cbo108, Cbo121, Cbo168	Wang *et al*., 2011
	Nesyt lesní (*Mycteria americana*)	Wsμ08, Wsμ13, Wsμ17, Wsμ18, Wsμ20	Tomasulo-Seccomandi *et al*., 2003
		WS4, WS6	Van Den Bussche *et al*., 1999
	Kolpík růžový (*Ajaia ajaja*)	Aaju4	Sawyer *et al*., 2006
	Kolpík malý (*Platalea minor*)	PM2-28, PM2-68	Yeung *et al*., 2009
	Ibis japonský (*Nipponia nippon*)	NnCE11, NnEB12	Ji *et al*., 2004
	Volavka žlutozobá (*Egretta eulophotes*)	Ae30	Huang *et al*., 2010
	Volavka červenavá (*Egretta rufescens*)	Er42, Er44	Hill *et* Green, 2010
	Kvakoš noční (*Nycticorax nycticorax*)	nycti15, nycti22, nycti36	Chang *et al*., 2009
Dlouhokřídlí (Charadrii-formes)	Alkounek drobný *(Aethia pygmaea)*	Apy06	Dawson *et al*., 2005

Tabulka 5: Přehled polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa simbila, které byly nalezeny v bakalářské práci Novosadové (2012). V tabulce je dále uveden zdrojový druh, jeho zařazení do řádu a autor publikace.

Řád	Zdrojový druh	Polymorfní mikrosatelity	Autor
Plameňáci (Phoenicopteri-formes)	Plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*)	PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrC101, PrD3, PrD108, PrD117, PrD121	Geraci *et al*., 2010
	Plameňák karibský (*Phoenicopterus ruber*)	Pruμ 6	Kapil *et al*., 2009
Veslonozí (Pelecaniformes)	Faeton žlutozobý (*Phaethon lepturus*)	P3D7	Humeau *et al*., 2010
	Fregatka obecná (*Fregata minor*)	Fmin08, Fmin13, Fmin17, Fmin18	Dearborn *et al.*, 2008
	Pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*)	PEL086	De Ponte Machado *et al*., 2009
	Pelikán severoamerický (*Pelecanus eythrorhynchos*)	PeEr 09	Hickman *et al*., 2008
	Kormorán ušatý (*Phalacrocorax auritus*)	COR 28	Fike *et al*., 2009
	Kormorán velký (*Phalacrocorax arostotelis*)	PcD6	Piertney *et al*., 1998
	Terej modronohý (*Sula nebouxii*)	Boob-RM4-D07	Faircloth *et al.*, 2009
		Sn2A-36, Sn2B-83	Taylor *et al.*, 2010
	Terej červenonohý (*Sula sula*)	Ss2b-138	Morris-Pocock *et al.*, 2010
	Terej guánový (*Sula variegata*)	Sv2A 26	Taylor *et al*., 2010

4.3.1 PCR amplifikace

Reakční směs pro *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů u čápa bílého, černého a simbila byla vytvořena napipetováním jednotlivých složek, které jsou uvedeny v tabulce 6, do 1,5 ml mikrozkumavky. Pro amplifikaci vždy 6 vzorků byly použity primery pro testované lokusy, které uvádí tabulka 3.

PCR mix pro genotypizaci 10 vzorků čápa simbila byl připraven obdobným způsobem, pouze se lišily objemy pipetovaných složek, které jsou také popsány v tabulce 6. Byly použity páry primerů, pro již známé polymorfní mikrosatelity, které jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5.

Tabulka 6: Složení reakčního mixu pro PCR amplifikaci 6 a 10 vzorků.

Složky PCR mixu	**Objem (µl) pro 6 vzorků**	**Objem (µl) pro 10 vzorků**
Deionizovaná voda	44,4	74
Reaction Buffer 10x	6,7	11
$MgCl_2$ (25 mmol/l)	4,0	6,6
dNTPs (20 µmol/l)	0,7	1,1
Primer F (10 µmol/l)	3,3	5,5
Primer R (10 µmol/l)	3,3	5,5
a*Taq* DNA-polymeráza (5U/µl)	1,0	1,6

Všechny použité chemikálie byly uchovávány v mrazáku při -20 °C a před použitím byly nejprve rozmrazeny, zvortexovány a zcentrifugovány. a*Taq* DNA-polymeráza se z mrazáku vyndávala pouze na nezbytně dlouhou dobu a krátce se vortexovala, aby nedošlo k jejímu poškození. Složky byly pipetovány v pořadí, jak je uvedeno v tabulce 6 a vytvořený PCR mix byl poté rozpipetován do 0,2 ml mikrozkumavek. Samotné PCR reakce se skládaly z 1 µl genomické DNA jednotlivých čápů a 9 µl reakční směsi. Takto připravené mikrozkumavky byly vloženy do termocykléru s nastaveným časovým a teplotním profilem:

5 min……. 94 °C

35x {
30 s…… 94 °C
30 s……zvolená teplota *annealingu*
30 s……. 72 °C
}

7 min…….. 72 °C

Pro všechny primery byla nejprve zvolena shodná teplota *annealingu* 50 °C. Tato teplota se u nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů dále upravovala v rozmezí 44-63 °C. Pokud testovaný pár primerů neposkytl žádný amplifikační produkt nebo byl produkt slabě viditelný, teplota *annealingu* se postupně snižovala. Jestliže byl PCR produkt příliš silný a nebylo možné od sebe rozeznat jednotlivé alely, teplota *annealingu* se postupně zvyšovala až na hodnotu 64 °C.

4.3.2 Zpracování PCR produktů

Tento postup je zoptimalizován po vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a s tloušťkou gelu 0,4 mm.

- Obě skla důkladně omýt vodou se saponátem a vydrhnout kartáčkem. Poté opláchnout deionizovanou vodou, osušit a dvakrát opláchnout 96% etanolem a osušit papírovým ubrouskem.
- Větší sklo ošetřit přípravkem na odpuzování vody na té ploše, kde se bude dotýkat gelu. Přípravek nechat působit 5 minut, pak opláchnout deionizovanou vodou a osušit papírovým ubrouskem.
- Menší sklo ošetřit 1 ml roztokem molekulárního lepidla na té ploše, kde bude gel. Roztok rozetřít papírovým ubrouskem a nechat působit 5 minut. Poté sklo 4x opláchnout 96% etanolem a pokaždé osušit papírovým ubrouskem.
- Velké sklo přemístit do digestoře a položit na polystyrenovou desku neošetřenou plochou dolů. Na ošetřenou plochu po stranách položit dva 0,4 mm tlusté spacery a na ně položit malé sklo ošetřenou stranou dolů. Spacery umístit až do kraje skel tak, aby se guma na nich těsně dotýkala kratšího skla.
- Připravit 6% polyakrylamidový gel a opatrně přelít z kádinky mezi skla, tak aby nevznikly bubliny v gelu.
- Když je prostor mezi skly vyplněn gelem, vložit mezi ně rovnou stranou hřebínek (v místě, kde se naléval gel) asi 1 cm hluboko. Na tuto stranu umístit klipsy a gel nechat asi 1 hodinu polymerizovat.

- Po ztuhnutí gelu všechny klipsy odstranit a sklo umýt od zbytků gelu. Umyté sklo umístit do elektroforetické komůrky hřebínkem nahoru a dovnitř upevnit pomocí šroubovacích úchytů.
- Katodový i anodový prostor zalít 0,5 x TBE pufrem a hřebínek opatrně vyjmout, tak aby nedošlo k poškození gelu. Prostor mezi skly důkladně vyčistit proudem pufru z injekční stříkačky. Katodový i anodový prostor uzavřít a na zdroji stejnosměrného proudu nastavit hodnotu výkonu 90 W. Sklo s gelem takto nechat nahřívat podobu 30 minut.
- 5 minut před nanesením vzorků (smíchat 1 objemový díl PCR produktu a 1 díl nanášecího pufru) je umístit na 3 minuty do denaturačních podmínek. Po denaturaci je okamžitě umístit do ledové tříště, čímž se zabrání renaturaci.
- Během denaturace vypnout zdroj stejnosměrného proudu a prostor mezi skly opět důkladně vyčistit. Poté do mezery vložit hřebínek asi 1 mm hluboko do gelu.
- Do mezer mezi zoubky hřebínku nanést osmikanálovou pipetou vzorky o objemu 2 μl. Na nanášení používat stejné špičky, které vždy vymýt opakovaným nasátím a vypuštěním pufru. Po nanesení vzorků katodový prostor uzavřít a na zdroji stejnosměrného proudu nastavit 70 W. Elektroforetickou separaci nechat běžet 1,5-4 hodiny.
- Během elektroforetické separace připravit fix/stop roztok a vývojku, která se umístí do ledničky vychladit.
- Po uplynutí doby elektroforetické separace vypnout zdroj stejnosměrného proudu, odpojit elektrody a otevřít kanálek, kterým pufr odtéká do sběrného prostoru. Sklo s gelem opatrně vyjmout, odstranit spacery a hřebínek a menší sklo s gelem odlepit pomocí nože od většího skla.
- Odchlípnuté menší sklo umístit do fotomisky na třepačku gelem nahoru a zalít fix/stop roztokem. Nechat působit asi 20 minut.
- Po uběhnutí doby slít fix/stop roztok zpět do kádinky, pro další použití. Poté malé sklo s gelem 3 krát po 3 minutách promýt deionizovanou vodou, umístit do fotomisky na třepačku a zalít po dobu 5 minut 1% roztokem HNO_3. Po uplynutí doby 4 krát po 3 minutých promýt deionizovanou vodou.
- Po omytí sklo s gelem opět umístit na třepačku a zalít 0,1% roztokem $AgNO_3$, do kterého těsně před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a nechat působit 30 minut.

- Poté sklo vyndat a umístit sklo s gelem asi na 5 vteřin do misky s deionizovanou vodou a poté zpět na třepačku, kde bylo zalito vývojkou. Během vyvíjení pozorovat vznik hnědočerných, stříbrem obarvených, proužků PCR produktů. Nakonec zalít fix/stop roztokem, který zabrání dalšímu vyvíjení.
- Obarvený gel přesunout asi na 30 minut do sušárny při 90 °C. K hodnocení použit negatoskop a vyhodnocený gel naskenovat do počítače pro uchování výsledků.
- Výsledky dále statisticky vyhodnotit pomocí genetických programů Cervus 3.0.3 a Genopop 4.1.

4.4 Použité chemikálie

- Akrylamid (AppliChem)
- a*Taq* DNA-polymeráza (5U/μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (100 mmol/l, 400 μl každého), U 1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Etanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Chloroform (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová - ledová (Lachema)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)
- N,N´-metylenbisakrylamid (AppliChem)
- N,N,N´,N´-tetrametylendiamin (TEMED) (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Proteináza K (Sigma)
- Clear Vue, Rain Repellent (Turtle WAX)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.5 Použité roztoky

- **Zásobní roztok 6% akrylamidu:**
  420 g močoviny
  484 ml deionizované vody
  50 ml 10 x TBE
  150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid:N,N´-metylenbisakrylamid 19:1 po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné láhvi ve 4 °C
- **Polyakrylamidový 6% gel:**
  60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
  400 μl 10% roztoku peroxodisíranu amonného $(NH_4)_2S_2O_8$
  40 μl N,N,N´,N´-tetrametylethylendiaminu
- **Zásobní roztok 10x TBE pufru:**
  108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
  55 g kyseliny borité H_3BO_3
  40 ml roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
  rozpustit v 800 ml deionizované vody, doplnit deionizovanou vodou na 1 l
- **Fix/stop roztok:**
  88 ml ledové kyseliny octové
  800 ml deionizované vody

- **Nanášecí pufr pro elektroforézu:**
  0,125 g bromfenolové modře
  0,125 g xylenové modře
  25 ml deionizované vody
  100 ml formamidu
- **Roztok 1% kyseliny dusičné HNO_3:**
  12 ml 65% HNO_3
  800 ml deionizované vody
- **Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného $AgNO_3$:**
  0,8 g dusičnanu stříbrného $AgNO_3$
  doplnit objem deionizovanou vodou na 800 ml
  před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu
- **Vývojka:**
  24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3
  800 ml deionizované vody
  umístit do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než 10 °C
  před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku thiosíranu sodného $Na_2S_2O_3$
- **Roztok 10% peroxodisíranu amonného $(NH_4)_2S_2O_8$:**
  1 g peroxodisíranu amonného $(NH_{4)2}S_2O_8$
  rozpustit v 10 ml deionizované vody, uchovávat v chladničce
- **Roztok hydroxidu sodného NaOH 1 mol/l:**
  40 g hydroxidu sodného NaOH
  rozpustit v 800 ml deionizované vody
  doplnit deionizovanou vodou na 1 l
- **Molekulární lepidlo:**
  1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
  3 μl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu
- **Queen´s pufr:**
  10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,8
  2 ml zásobního roztoku NaCl (5 mol/l)
  2,92 g ethylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA)
  10 g N-lauroylsarkosinu

rozpustit v 900 ml deionizované vody
pH upravit na 7,5
doplnit deionizovanou vodou na 1 l

- **TE pufr:**
  10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
  200 µl zásobního roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
  rozpustit v 900 ml deionizované vody
  doplnit deionizovanou vodou na 1 l a zfiltrovat

4.6 Laboratorní přístroje

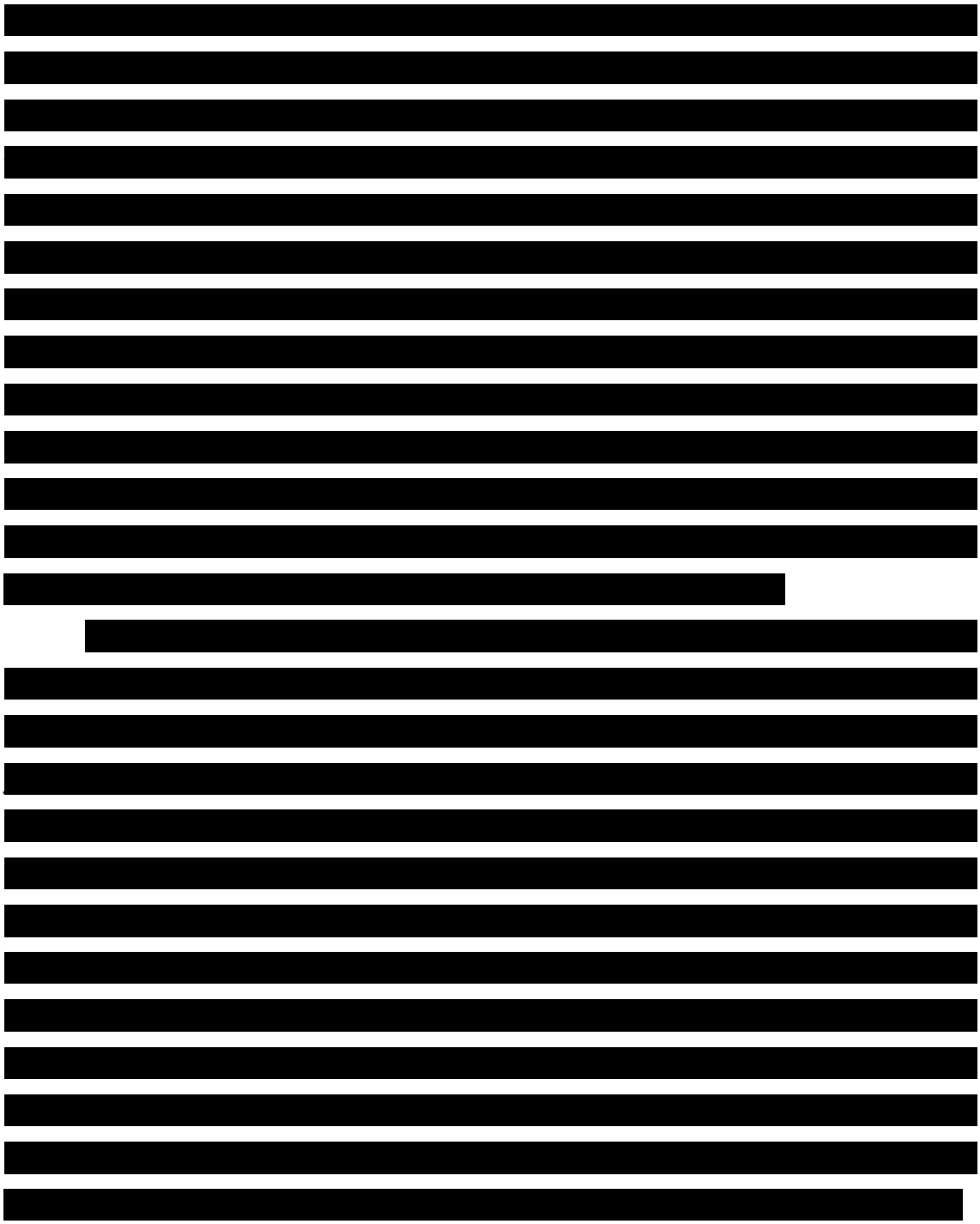
- Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)
- Elektroforetický zdroj EV 232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy MARK S 622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)
- Mikropipety Finnipipette 0,5 µl až 10 µl (osmikanálová) (Labsystems)
- Mikropipety Finnipipette 0,3 µl až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Cleaver Scientific)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna – sterilizátor CAT 8050 (Contherm)
- Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)
- Termocyklér GenePro (BIOER technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér XP Thermal Cycler (BIOER technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5. Výsledky

[redacted]

[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

[redacted]



[redacted]

[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										

[redacted]

[redacted]										
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

[redacted]

[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

[redacted]

[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										

[redacted]

[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										
[redacted]										

[redacted]

[redacted]										
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

6. Diskuze

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

[redacted]

[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

[redacted]

[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

7. Závěr

Ve své diplomové práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa bílého, čápa černého a čápa simbila. Prováděla jsem to metodou *cross-species* PCR amplifikace na DNA 6 nepříbuzných jedinců všech tří druhů čápů. K amplifikaci DNA čápa bílého a čápa černého jsem používala páry primerů původně navržené pro čápa východního a volavku rusohlavou z řádu brodiví a potápku západní z řádu potápky. U čápa simbila jsem prováděl amplifikaci pouze s páry primerů od volavky rusohlavé a potápky západní. Z celkového počtu 31 testovaných párů primerů jsem u čápa černého nenalezla žádné polymorfní produkty a u čápa bílého jsem objevila 5 polymorfních mikrosatelitových lokusů. S použitím 22 párů primerů jsem u čápa simbila nenalezla také žádný polymorfní produkt.

Dále jsem provedla genotypizaci 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila s použitím párů primerů, které již poskytly polymorfní produkty při *cross-species* PCR amplifikaci na 6 nepříbuzných jedincích čápa simbila v předešlých pracích. K dispozici jsem měla celkově 50 párů primerů od druhů z řádů brodiví, dlouhokřídlí, plameňáci a veslonozí. Metodou *cross-species* PCR amplifikace jsem u jednotlivých lokusů určila počet alel, optimální teplotu *annealingu* a optimální délku elektroforetické separace. Pomocí genetického programu Cervus 3.0.3 jsem provedla charakterizaci jednotlivých polymorfních mikrosatelitových lokusů a určila u nich očekávanou a pozorovanou heterozygotnost, zda lokusy jsou nebo nejsou v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou, obsah polymorfní informace a pravděpodobnost výskytu nulových alel. Díky dalšímu programu, Genepop 4.1, jsem zjišťovala, zda některé lokusy nejsou ve vazbě. U lokusů Wsμ17 a Wsμ18 program určil vysokou pravděpodobnost vazby, ale ve skutečnosti se jedná o jeden a tentýž lokus, na který byly navrženy dva páry primerů. Dále jsem zjišťovala vazbu lokusů na pohlaví. Jeden lokus jsem označila jako pohlavní marker, kde všechny samice byly heterozygotky a všichni samci homozygoti. U dalších 5 polymorfních lokusů jsem objevila pravděpodobnou vazbu na pohlavní chromozom Z. Pokud by tomu tak bylo, samice by byly homozygotní pro alelu Z, ale ve skutečnosti by se jednalo o hemizygotky a samci by byli homozygoti nebo heterozygoti pro jednu z alel.

Celkem se mi u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila podařilo charakterizovat 45 nezávislých polymorfních mikrosatelitových lokusů.

8. Seznam použitých zkratek

bp	*base pairs*, pár bází
DNA	*deoxyribonucleic acid,* deoxyribonukleotidová kyselina
H_{exp}	*expected heterozygosity*, očekávaná heterozygotnost
H_{obs}	*observed heterozygosity*, pozorovaná heterozygotnost
ND	*not done*, nevyhodnoceno
k	počet alel
PCR	*polymerase chain reaction*, polymerázová řetězová reakce
PIC	*polymorphic information content*, obsah polymorfní informace
Ta	*annealing temperature*, teplota nasednutí primerů
t_s	*separation time*, délka elektroforetické separace

9. Použitá literatura

Anmarkrud JA, Kleven O, Bachmann L, Lifjeld JT (2008): Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evolutionary Biology* 8, 138.

Barlow EJ, Telford A, Daunt F, Cavers S (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*, preprint.

Bennett P (2000): Demystified…Microsatellites. *Molecular Pathology* 53, 177-183.

Beran V, Vermouzek Z, Klvaňová A (2014): Proč se čápi stali Ptákem roku 2014? *Ptačí svět* 1, 4-7.

Boles WE (2005): A review of the australian fossil storks of the genus *Ciconia* (Aves: Ciconiidae), with the description of a new species. *Records of the Australian Museum* 57, 165-178.

Brown LH, Urban EK, Newman K (1993): The birds of Africa. Vol. 1, Academic Press, London.

Burianová E (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Burnie D (2008): Ptáci. Obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha.

Cahlíková R (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Campanini EB, Sanches A, Hatanaka T, del Lama SN (2012): Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from cattla tret (*Bubulcus ibis*) and cross-amplification in other Ardeidae species. *Conservation Genetic Resources* 4, 707-709.

Dai Y, Zhou X, Fang W (2013): Development and cross-species transferability of 23 microsatellite markers from the vulnerable Chinese Egret (*Egretta eulophotes*) using 454 sequencing. *Conservation Genetics Resources* 5, 1-4.

Dakin EE, Avise JC (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504-509.

Daniels J, Holmans P, Williams N, Turic D, McGuffin P, Plomin R, Owen MJ (1998): A Simple Method for Analyzing Microsatellite Allele Image Patterns Generated form DNA Pools and Its Application to Allelic Association Studies. *The American Journal of Human Genetics* 62, 1189-1197.

Dawson DA, Hunter FM, Pandhal J, Buckland R, Parham A, Jones IL, Bradshaw M, Jehle R, Burke T (2005): Assessment of 17 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5-15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes* 5, 289-297.

Dearborn DC, Hailer F, Fleischer RC (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* 8, 1399–1401.

del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona.

De Ponte Machado M, Feldheim KA, Sellas AB, Bowie RCK (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus nocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics* 10, 1033-1036.

Duffie C, Glenn TC, Hagen C, Parker P (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Recources* 8, 625-627.

Ellegren H (2004): Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Genetics* 5, 435-445.

Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.

Faircloth BC, Ramos A, Drummond H, Gowaty PA (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxii*). *Conservation Genetics* 1, 159-162.

Fike JA, Devault TL, Rhoedes OE (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* 9, 1183-1185.

Gaisler J (1994): Úvod do zoologie obratlovců. Masarykova Univerzita, Brno.

Gaisler J, Zima J (2007): Zoologie obratlovců. Academia, Praha.

Galbusera P, van Dongen S, Matthysen E (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1, 163-168.

Geraci J, Gaillard M, Bechnet A, Cezilly F, Wattier RA (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greather flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.

Griffiths R, Tiwari B (1993): The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8324 – 8326.

He PL, Wan QH, Fang SG, Xi IM (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics* 7, 157–160.

Hickman CR, Peters MB, Crawford NG, Hagen G, Glenn TC, Somers CM (2008): Development nad characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resourses* 8, 1439-1441.

Hill A, Green MC (2010): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* 3, 13-15.

Huang X, Zhou X, Chen M, Fang W, Chen X (2010): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics* 11, 1211-1214.

Hudec K, Balát F, Černý V, Černý W, Ferianc O, Folk Č, Formánek J, Gaiser J, Hachler E, Hanzák J, Havlín J, Hora J, Chalupský J, Klíma M, Klůz Z, Kožená I, Kux Z, Matoušek B, Mošanský A, Pelz P, Ryšavý B, Šťastný K, Toufar J, Veselovský V (1994): Ptáci - Aves, Díl I. Academia, Praha.

Humeau L, Da Silva D, Guérin F, Jaquemet S, Requier J-B, Le Corre M (2010): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Phaeton lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Recources*, preprint.

Humple DL (2009): Genetic structure and demographic impacts of oil spills in western and clark's grebe. Master's thesis, Sonoma State University, USA.

Chang Q, Xie Z, Li Q, Zhou K (2009): Microsatellite loci developed for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservation Genetics* 10, 1537-1539.

Ji YJ, Liu YD, Ding ChQ, Zhang DX (2004): Eight polymorfic microsatellite loci for critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4, 615-617.

Kahl MP (1972): Comparative ethology of the Ciconiidae. Part 4. The „typical" storks (Genera *Ciconia, Sphenorhynchus, Dissoura,* and *Euxenura*). *Zeitschrift für Tierpsychologie* 30, 225-252.

Kapil R (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations. Dissertation. University of North Texas, USA.

Kapil R, Sawyer GM, Preston L, Benjamin RC (2009): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982): Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

McGuire HL, Noor MAF (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes* 2, 170-172.

Mercer DM, Haig SM, Mullins TD (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in double-crested cormorant (*Phalocrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources* 2, 119-121.

Morris-Pocock JA, Taylor SA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources* 10, 404-408.

Navrátilová J (2009): Polymorfní DNA mikrosatelity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Nevimová K (2012): *Cros-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Novosadová E (2012): *Cros-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu veslonozí a plameňáci u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci**).**

Obručová E (2009): Polymorfní DNA mikrosatelity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294-307.

Piertney SB, Goostrey A, Dallas JF, Carss DN (1998): Highly polymorfic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology* 7, 138-140.

Paprskářová M (2012): *Cros-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u marabu afrického (*Leptoptilos crumeniferus*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).

Preston EL (2005): Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Ph.D. dissertation, University of North Texas, USA.

Primmer CR, Møller AP, Ellegren H (1996): A wide survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5, 365-378.

Riordan J, Gardner MG, Fitch AJ, Johnston GR (2012): Isolation, via 454 sequencing, and characterisation of microsatellites for *Phalacrocorax fuscescens*, the blackfaced cormorant (Aves:Phalacrocoracidae). *Australian Journal of Zoology* 60: 340-342.

Sachs JL, Hughes CR (1999): Characterization of microsatellite loci for red-necked grebes *Podiceps grisegena*. *Molecular Ecology* 8: 685-702.

Santos MS, Gonçalves EC, Barbosa MSR, Silva A, Schneider MPC (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes* 6, 307-309.

Sawyer GM, Benjamin RC (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes* 6, 677-679.

Seutin G, White BN, Boag PT (1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69, 82-90.

Shephard JM, 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*. *Conservation Genetics* 10, 1525-1528.

Slikas B (1997): Phylogeny of the avian family Ciconiidae (Storks) based on cytochrome b sequences and DNA-DNA hybridization distances. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8, 257-300.

Svensson L, Grant PJ (2004): Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého Východu. Nakladatelství Svojtka&Co., Praha.

Šťastný K, Bejček V, Hudec K (1998): Svět zvířat IV, Ptáci (1). Albatros, Praha.

Tautz D (1989): Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463-6471.

Taylor SA, Morris-Pocock JA, Sun Z, Friesen VL (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151, 525-528.

Tomasulo-Seccomandi AM, Schable NA, Bryan AL Jr, Brisbin IL Jr, del Lama SN, Glenn TC (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3, 563-566.

Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10, 967-981.

Van Den Bussche RA, Harmon SA, Baker RJ, Bryan AL Jr, Rodgers JA Jr, Harris MJ, Brisbin IH Jr (1999): Low levels of genetic variability in north american populations of the wood stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 116, 1083-1092.

Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* 14, 2807-2812.

Wang H. Lou X, Zhu Q, Huang Y, Zhou L, Zhang B (2011): Isolation and Characterization of Microsatellite DNA Markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science* 28, 606-608.

Yeung CKL, Hsu YC, Yao CT, LI SH (2009): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics* 10, 1081-1084.