

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Karolína Musilová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu
trubkonosí u čápa černého
(*Ciconia nigra*)**

Bakalářská práce

Karolína Musilová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Karolína MUSILOVÁ
Osobní číslo: R19846
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosů u čápa černého (*Ciconia nigra*).
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

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

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

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


Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.
Katedra buněčné biologie a genetiky

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

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan



prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 8. dubna 2022

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Karolína Musilová

Název práce: *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa černého (*Ciconia nigra*)

Typ práce: Bakalářská

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

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

Rok obhajoby: 2022

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa černého (*Ciconia nigra*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace.

Teoretická část charakterizuje řád Ciconiiformes a jeho fylogenezi, čeleď čápovití, v rámci které se věnuje zejména popisu čápa černého včetně jeho hnízdění, rozmnožování a rozšíření. Dále je zde uvedena charakteristika mikrosatelitů, jejich výskyt, využití a popis mikrosatelitů, které pocházejí od zástupců řádu trubkonosí.

Experimentální část se zabývá *cross-species* PCR amplifikací, která byla provedena testováním 213 párů primerů na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa černého, z nichž 207 bylo navrženo pro zástupce řádu trubkonosí, 5 od zástupců řádu dlouhokřídlí a 1 z řádu pěvci. Celkem bylo nalezeno 16 polymorfních mikrosatelitových lokusů s počtem alel 2–4. Sedm lokusů neposkytlo amplifikací žádný produkt a zbývajících 190 mikrosatelitových lokusů bylo monomorfních.

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

Počet stran: 57

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification**Author's first name and surname:** Karolína Musilová**Title of thesis:** Cross-species amplification of microsatellites from Procellariiformes in Black Stork (*Ciconia nigra*)**Type of thesis:** Bachelor**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University Olomouc**Supervisor:** RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**The year of presentation:** 2022**Abstract:**

This bachelor thesis focuses on finding polymorphic microsatellite loci of the Black Stork (*Ciconia nigra*) using cross-species PCR amplification.

The theoretical part characterizes the order Ciconiiformes and its phylogeny, the stork family and describes the Black Stork, its nesting, reproduction and distribution. It also characterizes the microsatellites, rate and use of microsatellites and describes the microsatellites of the species belonging to the order of the Procellariiformes.

The experimental part focuses on cross-species PCR amplification which was performed by testing 213 pairs of primers on the genomic DNA of 6 unrelated Black stork's individuals, of which 207 pairs were designed for species of the order Procellariiformes, 5 of the order Charadriiformes and 1 from the order Charadriiformes. There was found a total of 16 polymorphic microsatellite loci with number of alleles ranged from 2 to 4. Seven loci did not amplify the product. The remaining 190 microsatellite loci were monomorphic.

Keywords: Black stork, microsatellites, cross-species PCR amplification, Procellariiformes**Number of pages:** 57**Number of appendices:** 0**Language:** Czech

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

V Olomouci dne 6. 5. 2022

.....

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, poskytnuté materiály, veškerou pomoc, ochotu, vstřícnost a věnovaný čas při zpracování teoretické i experimentální části této práce. Dále bych chtěla poděkovat kolegyním a kolegovi z Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za pohodovou atmosféru a bezproblémovou domluvu při práci v laboratoři.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce	2
3. Literární přehled.....	3
3.1 Fylogeneze řádu Ciconiiformes	3
3.2 Řád Ciconiiformes	4
3.3 Čeď čápvití (Ciconiidae)	4
3.4 Čáp černý	5
3.4.1 Hnízdění, rozmnožování a péče o mláďata	6
3.4.2 Rozšíření a migrace	6
3.5 Mikrosatelity	7
3.5.1 Výskyt mikrosatelitů	7
3.5.2 Využití mikrosatelitů.....	7
3.5.3 Hledání mikrosatelitů	8
3.5.4 Mutační mechanismy mikrosatelitů	8
3.6 Mikrosatelity od druhů z řádu trubkonosí.....	8
3.6.1 Mikrosatelity od druhů z čeledi albatrosovití.....	9
3.6.2 Mikrosatelity od druhů z čeledi buňáčkovití	11
3.6.3 Mikrosatelity od druhů z čeledi buňáčkovití	12
4. Materiál a metody	16
4.1. Biologický materiál	16
4.2 Použité chemikálie	16
4.3 Použité roztoky	17
4.4. Použité laboratorní přístroje	18
4.5 PCR amplifikace DNA čápa černého.....	19
4.6 Elektroforetická separace	23
5. Výsledky	26
6. Diskuze	34
7. Závěr	41

Seznam obrázků

Obrázek 1 Fylogenetické vztahy uvnitř čeledi čápoovití dle Sheldon <i>et</i> Slikas (1997) a Slikas (1997, 1998)	4
Obrázek 2 Graf šestnácti polymorfních mikrosatelitových lokusů amplifikovaných u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého, rozdělených dle čeledí a druhů, od kterých pocházejí. 30	
Obrázek 3 Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu STAL8.	32
Obrázek 4 Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Cd3.	32
Obrázek 5 Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Paequ10.	32
Obrázek 6 Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Dc21.	33

Seznam tabulek

Tabulka 1 Složení PCR reakční směsi pro 6 vzorků.....	19
Tabulka 2 Seznam mikrosatelitových lokusů od druhů z čeledi albatrosovití, které byly testovány na polymorfismus u čápa černého.....	20
Tabulka 3 Seznam mikrosatelitových lokusů od druhů z čeledi buňňákovití, které byly testovány na polymorfismus u čápa černého.....	21
Tabulka 4 Seznam mikrosatelitových lokusů od druhů z čeledi buňňáčkovití, které byly testovány na polymorfismus u čápa černého.....	22
Tabulka 5 Seznam mikrosatelitových lokusů od druhů z řádu dlouhokřídlí a pěvci, které byly testovány na polymorfismus u čápa černého.....	22
Tabulka 6 Charakteristika 16 polymorfních lokusů amplifikovaných u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého.....	27
Tabulka 7 Genotypy 16 polymorfních mikrosatelitových lokusů amplifikovaných 16 páry primerů u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého.....	31
Tabulka 8 Mikrosatelitové lokusy pocházející od zástupců řádu trubkonosí polymorfní u čápa černého, porovnané s polymorfními mikrosatelitovými lokusy u dalších druhů, na kterých v rámci Laboratoře populační genetiky byly mikrosatelitové lokusy od trubkonosých testovány	39

1. Úvod

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice s délkou repetitivní jednotky 1–6 bp. Nacházejí se rozptýleně v prokaryotických i eukaryotických genomech. Díky jejich vysoké variabilitě, alelové kodominanci a relativně vysoké frekvenci výskytu jsou používány jako molekulární markery například při genetickém mapování, analýze příbuzenství a paternity.

Čáp černý je velký, ale díky svému skrytému způsobu života málo frekventovaný pták české ornitofauny. Jeho výskyt na území České republiky byl v minulosti vzácný, v posledních letech se jeho početnost zvýšila. Do povědomí se dostal i díky projektu Africká Odyssea, kdy byli čápi černí sledováni na svých cestách do zimoviště.

V rámci této bakalářské práce budu pomocí *cross-species* PCR amplifikace za využití primerů, které byly navrženy pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů pocházejících od druhů z řádu trubkonosí, hledat polymorfni mikrosatelitové lokusy u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého (*Ciconia nigra*), zástupce velkých brodivých ptáků z řádu Ciconiiformes.

2. Cíle práce

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

4. Literární přehled

3.1 Fylogeneze řádu Ciconiiformes

Základní klasifikace v souladu s morfologickými i fylogenetickými studiemi dělí ptáky na Paleognathae (běžce) a Neognathae (letce a ostatní ptáky). Neognathae lze dále rozdělit na 2 klady: prvním kladem je Galloanserae, kam patří vrubozobí (Anseriformes) a hrabaví (Galliformes) a druhým je Neoaves, zahrnující ostatní neognátní ptáky, do které patří většina vodních ptáků (Hackett *et al.*, 2013).

Ptáci, tvořící velmi rozmanitou skupinu, byli dříve děleni především dle rozdílné morfologie, ekologie a chování (Prum *et al.*, 2015), dnešní molekulární techniky však tento koncept zpochybňují. Ke změnám došlo zejména uvnitř kladu Neoaves, představujícím téměř veškerou ptačí diverzitu (Hackett *et al.*, 2013).

V tradičním pojetí řád Ciconiiformes zahrnoval čeledi čápovité (Ciconiidae), volavkovité (Ardeidae), ibisovité (Threskiornithidae), kladivoušovitá (Scopidae) a člunozubcovité (Balaenicipitidae) (Gaisler *et Zima*, 2018). Dnes jsou do řádu Ciconiiformes řazeni jen čápovití (Ciconiidae). Ke změnám vlastní koncepce tohoto řádu docházelo během posledních 30 let.

Sibley *et Ahlquist* (1988) dle klasifikace založené na studiích DNA-DNA hybridizace navrhli do řádu Ciconiiformes zařadit čeledi volavkovití, kladivoušovité, plameňákovití (Phoenicopteridae), ibisovití, čápovití a pelikánovití (Pelecanidae). Čeleď čápovití dle této studie spadala do nadčeledi Ciconioidea.

Prum *et al.* (2015) na základě své fylogenetické analýzy dat 198 ptačích druhů rozdělili původní klad Neoaves na 5 hlavních sesterských kladů: Strisores, Columbaves, Gruiformes, Aequorlornithes a Inopinaves. Nově vzniklý komplexní klad Aequorlornithes sdružuje všechny ptáky spojené s vodním prostředím kromě vrubozobých, byli zde zařazeni plameňáci, potápky, potáplice, tučňáci, trubkonosí, pelikáni, veslonozí a čápi.

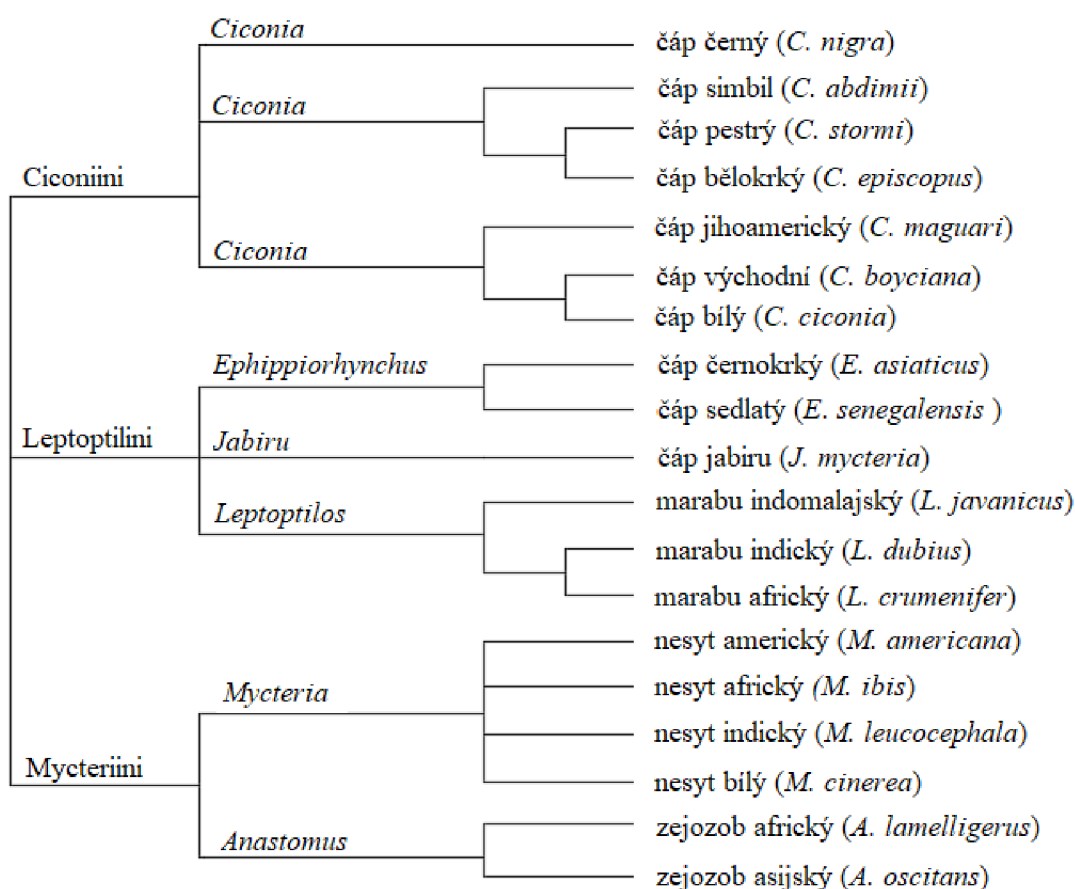
Vzhledem k tomu, že čeledi kladivoušovité, člunozubcovité, volavkovité, a ibisovití, které tvořily tradiční řád brodivých (Ciconiiformes), vykazovaly blízký vztah s čeledí pelikánovití, byla popřena původní monofylie řádů brodivých a veslonožích (Pelecaniformes), do kterého byly dříve řazeny čeledi: pelikánovití, kormoránovití (Phalacrocoracidae), anhingovití (Anhingidae), terejovití (Sulidae), fregatkovití (Fregata) a faetonovití (Phaethontidae) (Gaisler *et Zima*, 2018). V dnešním pojetí jsou do řádu Ciconiiformes řazeni jen čápovití (Ciconiidae). Původní čeledi řádu brodivých: ibisovití, volavkovité a kladivoušovité nyní tvoří řád Pelecaniformes společně s čeledmi pelikánovití (Pelecanidae) a člunozubcovité (Balaenicipitidae) (Winkler *et al.*, 2020). Ostatní čeledi dříve tvořící řád veslonožích (Pelecaniiformes) byly z řádu vyčleněny a nyní tvoří samostatné řády.

3.2 Řád Ciconiiformes

Řád Ciconiiformes nyní zahrnuje pouze jedinou čeleď čápoovití (Ciconiidae) (Gaisler *et Zima*, 2018).

3.3 Čeleď čápoovití (Ciconiidae)

Čeleď čápoovití tvoří v aktuálním pojetí jedinou čeleď řádu Ciconiiformes. Do čeledi je řazeno 19 druhů čápů rozdělených do šesti rodů (Winkler *et al.*, 2020). V minulosti se zařazením jednotlivých rodů a druhů do čeledi zabývali Sheldon *et Slikas* (1997) a sám Slikas (1997, 1998). Na Obrázku 1 je znázorněno rozdělení čeledi čápoovití dle jejich návrhu.



Obrázek 1 Fylogenetické vztahy uvnitř čeledi čápoovití dle Sheldon *et Slikas* (1997) a Slikas (1997 a 1998).

Čeleď čápoovití je rozdělena do tří tribů (Mycteriini, Leptoptilini, Ciconiini) (Kahl, 1971, 1979). První tribus tvoří 2 rody: *Anastomus* a *Mycteria*. Rod *Anastomus* zahrnuje 2 druhy: zejzoba afrického a asijského, rod *Mycteria* zahrnuje 4 druhy: nesyta amerického, afrického, bílého a indomalajského. Druhý tribus tvoří 3 rody: *Leptoptilos*, *Jabiru* a *Ephippiorhynchus*. Rod *Leptoptilos* zahrnuje 3 druhy: marabu indomalajského, afrického a indického. Rod *Jabiru* tvoří jediný druh, čáp jabiru. Rod *Ephippiorhynchus* sestává ze 2 druhů: čápa černokrkého a sedlatého.

Třetí tribus tvoří rod *Ciconia*, do kterého patří 7 druhů: čáp bílý, černý, simbil, bělokrký, pestrý, jihoamerický a východní.

Čápovitě lze charakterizovat jako velké ptáky s protáhlým krkem, dlouhým klínovitým zobákem a dlouhýma brodivýma nohama. Čápi výborně létají, zejména plachtí, po zemi se pohybují pomalým krokem (Gaisler *et* Zima, 2018). Jejich potrava je rozmanitá, zahrnuje červy, hmyz, obojživelníky a další drobné obratlovce. Čápi obývají otevřené i lesní krajiny, často v blízkosti vodních toků a stojatých vod, marabuové však ke svému životu preferují suché prostředí (Hudec *et* Šťastný, 2016). Čápi jsou většinou monogamní, čáp bílý a černý, žijící na území České republiky, hnízdí v párech, které sídlí samostatně, některé páry exotických druhů čápů mohou vytvářet menší hnízdní kolonie. Na vysokých místech, jako jsou stromy a komíny, si čápi stavějí z větví a hlíny hnízda o průměru asi 80 cm a výšce 30–40 cm, která často přistavují a zdokonalují, hnízda, která poté dosahují vnějšího průměru až 2 m, obývají i několik let. Jsou rozšířeni téměř po všech kontinentech, v severních částech svých areálů jsou stěhovaví, v jižních částech přezimují. Některé druhy jsou tažné, například čáp bílý táhne ze severní Evropy až do jižní Afriky (Hudec *et* Šťastný, 2016).

3.4 Čáp černý

Systematické zařazení čápa černého dle Gaisler *et* Zima (2018):

Říše:	Animalia (živočichové)
Kmen:	Chordata (strunatci)
Třída:	Aves (ptáci)
Podtřída:	Neognathae (letci)
Řád:	Ciconiiformes (čápi)
Čeleď:	Ciconiidae (čápovití)
Rod:	<i>Ciconia</i> (čáp)
Druh:	<i>Ciconia nigra</i> (čáp černý)

Čáp černý je velký brodivý pták převážně černé barvy se zelenofialovým leskem, spodní strana těla je bílá. Na hrdle má prodloužená černá pera (Hudec *et* Šťastný, 2016). Tělo čápa včetně protáhlého krku, dlouhého klínovitého červeného zobáku, značně protáhlých červených nohou a krátkého ocasu, dosahuje délky přibližně 95–100 cm (Hutchins *et al.*, 2002). Podobně jako pro čápa bílého je pro něj charakteristická poloha těla při letu, kdy má natažené nohy a krk, který však drží níže než hřbet, a proto se z boku jeví „hrbatý“. Během letu má do široka roztažená zakulacená křídla (Hudec *et* Šťastný, 2013). Samec a samice nejsou barevně odlišeni. Mláďata se podobají dospělcům, ale jejich opeření je většinou bez lesku. Hlavu, krk a hrud' mají mláďata tmavě šedohnědé, pera jejich lopatek a křídel mají světle žlutohnědé špičky, zobák je oranžově žlutý (Hudec *et* Šťastný, 2016). Čáp černý má téměř nezatelný hrdelní vak, který mu slouží

k transportu potravy mládřatům do hnízda. Klape krátce a slabě zobákem, v porovnání s čápem bílým však vzácněji, někdy vydává hlasité syčivé a hvízdavé zvuky, to zejména u hnízda a pouze po krátké časové období (Černý, 1980).

3.4.1 Hnízdění, rozmnožování a péče o mládřata

Čáp černý obývá zejména lesnaté oblasti mírného pásu bohaté na potoky, řeky a stojaté vody. Občas se vyskytuje i na loukách, polích a rybnících (Hudec *et* Šťastný, 2016). Čáp černý je poněkud plachý, vyhledává skrytá a klidná místa, oblastem s lidským osídlením se vyhýbá (Černý, 1980). Hnízdo v korunách listnatých i jehličnatých stromů, někdy i ve skalách, stavějí samec a samice společně a užívají ho až několik let. Silné větve slouží jako pevný základ hnízda, uvnitř jsou menší větvičky a vnitřek hnízda vystylají mechy, lišejníky a travnaté dmy (Hora *et al.*, 2015). Jednotlivé páry hnízdí samostatně. Do hnízdiště přilétají samec a samice nezávisle, často dlouho krouží nad hnízdištěm, na hnízdě se poté vzájemně obchází a staví se do vypínavých postojů. K páření dochází na hnízdě (Hudec *et* Šťastný, 2016). Od dubna do května samec, ale hlavně samice po dobu 32–38 dní sedí na vejcích. Potravu do hnízda pro mládřata přináší samec i samice v hrdelním vaku. Mládřata jsou schopná létat po 55–65 dnech a za dospělé jedince jsou považována ve věku tří let. Potravu, nejčastěji ryby, žáby, plazy a vodní bezobratlé živočichy, loví svým dlouhým klínovitým zobákem jak v mělkých potocích a říčkách, ve kterých se brodí, tak i mimo vodní biotopy na polích a loukách (Hora *et al.*, 2015).

3.4.2 Rozšíření a migrace

Rozšíření čápa černého je palearktické. Hnízdí od západní Evropy až po Dálný východ. Čápi černí žijící v Evropě zimují v subsaharské Africe a v jižní Asii (Hudec *et* Šťastný, 2016). Izolovaná populace, žijící v jihovýchodní Africe, má pravděpodobně původ u zimujících předků. V Evropě jeho rozšíření na severu zasahuje až do Pobaltí, na západě a na jihu je jeho rozšíření různé. Četnost populace čápa černého prodělala v průběhu 19. a 20. století velké změny. Na území dnešní České republiky hnízdil v 19. století jen ojediněle, ve 30. letech 20. století došlo k šíření druhu a nárůstu populace (Hora *et al.*, 2015). V posledních letech se četnost populace čápa černého v Evropě nezvyšuje, vzhledem k tomu, že četnost jeho populace ani neklesá a vzhledem k velmi rozsáhlému území, které čáp černý obývá, nepatří mezi ohrožené druhy (Anonymous, 2021).

Čáp černý je tažný pták a dálkový migrant, většinu cesty do zimoviště uletí za dne, přičemž mu během plachtění napomáhají termické konvekce nad pevninou, většinou se delšímu přeletu přes moře vyhýbá. Jeho hlavní zimoviště se nachází v subsaharské Africe, v pásu tzv. Sahelu od Senegalu na západě, přes Mali, Nigérii, Čad, Středoafriickou republiku až po Etiopii. Byli zaznamenáni jedinci přezimující v jihozápadní Evropě a na Blízkém východě (Hudec *et* Šťastný, 2016).

3.5 Mikrosatelity

Mikrosatelity, známé též jako krátké tandemové repetice, STR (Short Tandem Repeats), nebo jednoduché repetitivní sekvence, SSR (Simple Sequence Repeat), jsou úseky DNA skládající se z 1–6 bp dlouhých tandemově se opakujících, tedy bezprostředně za sebou jdoucích jednotek o celkové délce 10–100 bp (Kantartzi, 2013). Různí autoři však uvádějí různá čísla. Mikrosatelity jsou známé vysokou variabilitou, alelovou kodominancí a relativně vysokou frekvencí výskytu, proto patří mezi důležité molekulární markery (Küpper *et al.*, 2008).

3.5.1 Výskyt mikrosatelitů

Mikrosatelity se nacházejí v prokaryotických i eukaryotických genomech, v oblastech kódujících proteiny i nekódujících oblastech, jejich výskyt je však častější v nekódujících oblastech než v exonech a celkový obsah repetitivních sekvencí v genomu koreluje s velikostí genomu organismu (Hancock, 1996).

Dle počtu opakujících se repetice lze jednotlivé mikrosatelity označit jako mononukleotidové, di-, tri-, tetra-, penta- až hexanukleotidové (Tóth *et al.*, 2000).

Zastoupení trinukleotidových repetice je v exonech nejhojnější, dalšími bohatě zastoupenými repeticemi v exonech jsou repetice hexanukleotidové, jejich výskyt je však větší v intergenních oblastech a intronech. U obratlovců a členovců byla AC pozorována jako nejčastější dinukleotidová repetitivní sekvence. Trinukleotidové repetice jsou významně zastoupeny ve všech částech genomu, jejich frekvence se však u různých taxonů liší. U většiny taxonů se repetitivní sekvence ACG a ACT vyskytují v nízkém počtu, repetice AAT jsou ve vysokém počtu zastoupeny u obratlovců (studováno u primátů), členovců a hub (konkrétně u kvasinek). Tetranukleotidové repetice se v exonech téměř nevyskytují. Výskyt tetranukleotidových repetice je v intronech a intergenních oblastech u obratlovců však častější, než výskyt trinukleotidových repetice. Některé hexanukleotidové repetice AACCT a AATCC byly pozorovány jako telomérové repetitivní sekvence (Tóth *et al.*, 2000).

Mikrosatelity někdy mohou být asociovány s dalšími genomovými repeticemi, zejména s transpozony (Kantartzi, 2013).

3.5.2 Využití mikrosatelitů

Mikrosatelity se používají k odhadu genetické variace na molekulární úrovni, jejíž znalost je důležitá pro charakterizaci organismu nebo populace a studium taxonomických a fylogenetických vztahů (Kantartzi, 2013). Tyto kodominantní, vysoce variabilní a somaticky stabilní molekulární markery relativně malé velikosti jsou dále běžně využívány při genetickém mapování, ve šlechtitelských programech, při určování příbuznosti, při testování identity a paternity ve forenzní analýze DNA (Oliveira, *et al.*, 2016).

3.5.3 Hledání mikrosatelitů

Rozlišují se tři základní metody hledání mikrosatelitů. První metodou je získávání mikrosatelitů *de novo*. Tento způsob hledání specifických markerů pro každý druh zvláště je však finančně a časově náročný, protože znamená konstrukci knihovny restričních fragmentů z DNA daného druhu a následné hledání mikrosatelitových sekvencí. Přestože jsou mikrosatelity v eukaryotickém genomu všudypřítomné, jejich výskyt koreluje s velikostí genomu a například v genomu ptačím je kvůli jeho malé velikosti zastoupení mikrosatelitů menší než v genomech jiných obratlovců (Primmer *et al.*, 1997). K hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů u zkoumaného druhu je možné použít metodu tzv. *cross-species* PCR amplifikace, využívající páry primerů, které byly navrženy pro jiný zdrojový druh. Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace a pravděpodobnost, že budou mikrosatelity aplikovatelné, je tím větší, čím jsou zkoumaný a zdrojový druh fylogeneticky příbuznější (Küpper *et al.*, 2008). S rozvojem sekvenačních metod se používá *in silico* metoda vyhledávání mikrosatelitových lokusů, kdy jsou pomocí specializovaných bioinformatických softwarů z genomových knihoven vyhledávány a porovnávány sekvence mikrosatelitů s požadovanými vlastnostmi, pro jejichž amplifikaci jsou následně navrhovány páry primerů.

3.5.4 Mutační mechanismy mikrosatelitů

Princip mutační dynamiky mikrosatelitů prozatím není možné přesně vysvětlit, rychlost mutací je zde však vyšší, než v ostatních částech genomu. Pohybuje se od 10^{-2} do 10^{-6} nukleotidů na lokus v jedné generaci (Küpper *et al.*, 2008).

Předpokládaným hlavním způsobem vzniku mutací je mechanismus DNA *slippage* neboli sklouznutí DNA polymerázy během replikace DNA způsobující špatné spárování nově vznikajícího řetězce s původní sekvencí. V rámci reparace dojde k vytvoření smyčky a syntéze jiného počtu repetit. Vytvoří-li se smyčka ve vznikajícím řetězci, dochází ke zvýšení počtu repetit. Vytvoří-li se smyčka v templátovém řetězci, dochází ke ztrátě repetit. Dalším mutačním mechanismem je proces rekombinace umožňující změnit délku SSR repetit v průběhu nerovnoměrného *crossing-overu* a genové konverze. Akumulaci tandemových repetit v genomu také významně ovlivňuje genetický drift a selekce (Kantartzi, 2013).

3.6 Mikrosatelity od druhů z řádu trubkonosí

Řád trubkonosí (Procellariiformes) je rozdělen do 4 čeledí: albatrosovití (Diomedidae), buňňákovití (Procellariidae), buňňáčkovití (Hydrobatidae) a buňňíkovití (Pelecanoididae). Laboratoř populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Univerzity Palackého v Olomouci má k dispozici 207 párů primerů, navržených pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů pocházejících od čeledi albatrosovití, buňňákovití a buňňáčkovití, od čeledi buňňíkovití nemá laboratoř k dispozici žádné primery.

Dále je v laboratoři k dispozici 5 párů primerů, které byly původně navrženy pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů od řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), pocházejících od alkouna obecného (*Cephus guillemots*), kulíka mořského (*Charadrius alexandrinus*) a racka novozélandského (*Chroicocephalus scopulinus*) a 1 pár primerů navržený pro řád pěvci (Passeriformes), pocházející od lesňáčka žlutého (*Dendroica petechia*), které byly již dříve úspěšně použity pro *cross-species* PCR amplifikaci u některých druhů řádu trubkonosí.

3.6.1 Mikrosatelity od druhů z čeledi albatrosovití

Laboratoř populační genetiky má k dispozici 53 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů, které byly izolované ze 7 druhů z čeledi albatrosovití: albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), jižního (*D. antipodensis*), šedohlavého (*Thalassarche chrysostoma*), černobrvého (*T. melanophris*), laysanského (*Phoebastria immutabilis*), černonohého (*P. nigripes*) a bělohřbetého (*P. albatrus*).

Burg (1999) izolovala a charakterizovala 26 mikrosatelitových lokusů, pocházejících ze dvou druhů: albatrosa šedohlavého a stěhovavého. Do této doby nebyly z čeledi albatrosovití publikovány žádné mikrosatelitní markery. Genomová DNA, izolovaná z albatrosa šedohlavého a stěhovavého, byla štěpena pomocí restriční endonukleázy *AluI*, vybrané fragmenty o velikosti 300–800 bp byly ligovány do plazmidu Puc19 a následně transformovány do *DH5α Escherichia coli*. Za použití (AC)₁₅ syntetických oligonukleotidů byly vybrány klony s repeticí (AC)₁₅ a pomocí hybridizace byly zkonstruovány genomové knihovny. Primery byly původně navrženy pro 31 mikrosatelitních sekvencí, pouze u 26 z nich došlo provedením PCR reakce ke vzniku viditelného PCR produktu. Tyto mikrosatelitové sekvence byly následně použity pro *cross-species* PCR amplifikaci za použití DNA izolované z albatrosa stěhovavého z rodu *Diomedea*, šedohlavého a černobrvého z rodu *Thalassarche*. Dvacet jedna lokusů poskytlo polymorfní produkt alespoň u jednoho druhu a jejich úroveň polymorfismu se pohybovala v rozmezí 2–11 alel. Dva lokusy: Dc10 a Dc19 u albatrosa stěhovavého neposkytly amplifikační produkt, u dalších dvou druhů byly amplifikovány.

Burg *et* Croxall (2001) se pomocí analýzy mikrosatelitových lokusů zabývali taxonomií, fylogenetickými a globálními vztahy v populaci albatrosa šedohlavého a černobrvého. Výzkum byl proveden na genomové DNA, izolované z jedinců albatrosa černobrvého a šedohlavého, žijících na šesti různých ostrovech v Jižním oceánu. K analýze byly využity již charakterizované mikrosatelitové lokusy (Burg, 1999), které byly navíc obohaceny o nově popsany lokus De35. U tohoto lokusu autoři detekovali 7–12 alel v 5 různých populacích albatrosa černobrvého a 8–22 alel ve 4 populacích albatrosa šedohlavého. Celkem bylo testováno 765 jedinců albatrosa černobrvého a 756 jedinců albatrosa šedohlavého. Z celkového počtu 37 lokusů, izolovaných z albatrosů, bylo vybráno 7 nejvariabilnějších mikrosatelitových lokusů. U albatrosa černobrvého

se výskyt alel v těchto 7 lokusech pohyboval v rozmezí 4–13 alel na lokus a u šedohlavého 5–22 alel na lokus.

Burg *et Croxall* (2004) dále testovali 9 mikrosatelitových lokusů, kdy se konkrétně zabývali fylogenetickým vztahem tří druhů: albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), jižního (*D. antipodensis*) a Gibsonova (*D. gibsoni*). Použitá DNA byla izolovaná z celkem 772 vzorků krve dospělých jedinců albatrosů stěhovavých, pocházejících ze 7 souostroví v Jižním oceánu. Byly využity dříve nalezené mikrosatelitové lokusy (Burg, 1999), ke kterým byl přidán nově popsáný lokus De 37, u kterého autoři detekovali 6–7 alel. U jednoho z mikrosatelitových lokusů (De 33) bylo zjištěno, že je vázán na pohlaví, a proto byl z analýzy vyřazen.

Dubois *et al.* (2005) ve svých studiích popsali 10 variabilních dinukleotidových mikrosatelitových lokusů u albatrosa stěhovavého, variabilitu testovali u dvou populací pocházejících ze soustroví Crozet a jedné populace ze soustroví Kergueleny, každá populace zahrnovala 20 jedinců. Studium lokusů populací ze soustroví Crozet bylo zjištěno, že některé lokusy vykazovaly omezený polymorfismus a u některých z nich se vyskytovaly ve vysoké frekvenci nulové alely. DNA byla izolovaná z krve pomocí soupravy QIAmp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitové lokusy byly izolovány z knihovny obohacené o (TC)₁₀ a (TG)₁₀ repetice s použitím biotinem značených mikrosatelitových sond a streptavidinem potažených magnetických kuliček. Pomocí TC₁₀, TG₁₀, AGE₁ nebo AGE₂ oligonukleotidů byly metodou modifikované polymerázové řetězové reakce (PCR) testovány rekombinantní klony. Bylo vybráno 94 vhodných testovaných sekvencí, pro které byly navrženy primery a 15 lokusů s nejvyšším počtem nepřerušovaných repetice bylo vybráno pro další amplifikaci. Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla prováděna jednotlivě na každém lokusu a poté byla multiplexována na skupiny mikrosatelitních lokusů (6A3, 12H8 a 11F3) a (7D8, 12C8, 11H7, 10C5 a 11H1). Z 15 amplifikovaných lokusů bylo 10 polymorfních a alely se vyskytovaly v počtu 2–13 na lokus.

Hernandez *et al.* (2014) charakterizovali 15 mikrosatelitových lokusů u tří ohrožených nebo téměř ohrožených druhů: albatrosa čermonohého, laysanského a bělohřbetého, k jejichž důkladnějšímu studiu genetické struktury jejich populace doposud chyběly vhodné markery. Pro studium mikrosatelitových lokusů byla pomocí soupravy DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) extrahovaná genomová DNA ze svalové tkáně 36 jedinců albatrosů čermonohých, 12 jedinců albatrosa laysanského a 3 jedinců albatrosa bělohřbetého. Za použití soupravy NEBNext Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina a Multiplex Oligos for Illumina byla zkonstruována genomová knihovna. Bylo vybráno 44 potenciálně amplifikujících lokusů s di-, tri- a tetranukleotidovými repeticemi. Využitím překrývajících se segmentů DNA, tzv. kontigů, byly v programu Primer 3 navrženy primery. Polymorfismus byl dále testován na 16 vybraných lokusech u celkem 51 jedinců albatrosů. Testováním mikrosatelitových lokusů albatrosa

černonohého a laysanského byl pozorován polymorfismus na 13 z nich a alely se na jednotlivých lokusech vyskytovaly v počtu 2–18. U albatrosa bělohřbetého zjistili, že 14 lokusů bylo polymorfních s počtem alel 2–7.

3.6.2 Mikrosatelity od druhů z čeledi buňňáčkovití

Laboratoř populační genetiky má k dispozici celkem 54 párů primerů, pro popsané mikrosatelitové lokusy, které byly izolované ze 3 druhů čeledi buňňáčkovití: buňňáčka madeirského (*Oceanodroma castro*), dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*) a Monteirova (*O. monteiroi*).

U dvou druhů buňňáčků: buňňáčka madeirského a dlouhokřídlého popsali Sun *et al.* (2009) 10 mikrosatelitových lokusů. Ze zmrazených vzorků krve 7 jedinců buňňáčka madeirského byla pomocí klonování zkonstruována genomová knihovna (Glenn *et Schable*, 2005). Z knihovny obsahující celkem 96 klonů obohacených o repetice bylo 53 z nich sekvenováno. U 46 klonů se vyskytovaly mikrosatelitové lokusy a u 20 z nich byly pozorovány složené nebo přerušované repetice. Pro 9 z nich byly v programu Primer 3 navrženy primery. Genomová knihovna byla pro buňňáčka dlouhokřídlého zkonstruována z DNA izolované ze zmrazených vzorků tkáně 2 jedinců. Pouze pro 2 z 21 byly navrženy primery a k amplifikaci byl použit jen 1 pár. Variabilita těchto mikrosatelitových lokusů byla testována na z krve izolovaných vzorcích DNA 27 jedinců buňňáčka madeirského, 22 jedinců buňňáčka Monteirova a 24 jedinců buňňáčka dlouhokřídlého. U buňňáčka madeirského a Monteirova bylo amplifikováno 10 mikrosatelitních lokusů: Oc28B, Oc49, Oc51, Oc63, Oc64B, Oc79, Oc79-2, Oc84, Oc87B, OI10-39. Všechny lokusy kromě jednoho byly polymorfni. Na jedincích z čeledi buňňáčkovití, konkrétně buňňáčkovití galapázkém a límčovém byla spolu s buňňákem tmavohřbetým z čeledi buňňáčkovití, provedena *cross-species* PCR amplifikace. Lokusy Oc64B a Oc79-2 amplifikací neposkytly žádný produkt, autoři počet polymorfních lokusů včetně alel neuvádějí.

Bicknell *et al.* (2011) testovali 41 polymorfních mikrosatelitových lokusů na 24 nepříbuzných jedincích buňňáčka dlouhokřídlého, pocházejících z populací žijících na ostrově Gull. Do výzkumu bylo zahrnuto 7 již charakterizovaných mikrosatelitových lokusů izolovaných z různých druhů buňňáčkovitých (Sun *et al.*, 2009) a 47 mikrosatelitových lokusů se sadami primerů, které jsou díky jejich vysoké přenositelnosti využívány v *cross-species* PCR amplifikaci (Dawson *et al.*, 2010). Genomová DNA, izolovaná z krve jedinců buňňáčka dlouhokřídlého, byla extrahovaná pomocí precipitační metody s octanem amonným. Byla zkonstruována genomová knihovna, která byla navíc obohacena o repetice (GT)_n, (CT)_n, (GTAA)_n, (CTAA)_n, (TTTC)_n a (GATA)_n, navázané na magnetické kuličky (Glenn *et Schable*, 2005). Transformované kolonie byly sekvenovány a bylo z nich izolováno 211 nových mikrosatelitových sekvencí, pro 50 unikátních sekvencí byly pomocí programu Primer 3 navrženy primery. Tyto nové mikrosatelitové lokusy byly testovány na 4–6 nepříbuzných jedincích, 26 lokusů bylo

vyhodnoceno jako polymorfní a amplifikací 6 lokusů nevznikl žádný produkt. Ze 47 již existujících lokusů, testovaných u 7 jedinců, bylo 15 polymorfních a 2 lokusy nebyly amplifikovány. Alely se celkem na 41 polymorfních lokusech vyskytovaly v počtu 2–22. Tři lokusy: Ol10-39, Ole12 a Ole 26 byly vázány na pohlaví.

Bried *et al.* (2012) popsali 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů v populaci buňňáčka Monteirova. Genomová DNA byla extrahována z krve pomocí soupravy QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Mikrosatelitové lokusy byly izolované ze sestavených obohacených genomových knihoven, které byly následně sekvenovány. Bylo vybráno 27 sekvencí, jejichž velikosti se pohybovaly v rozmezí 80–469 bp a obsahovaly motiv delší, než 5 repetice. Pro další analýzu bylo z důvodu výskytu problémů při amplifikaci použito pouze 18 sekvencí. Nejprve byl každý lokus amplifikován zvlášť a poté byly multiplexovány na skupiny: Omn8, Omn15, Omn17, Omn21 a Omn28; Omn1, Omn2, Omn3, Omn4, Omn6, Omn14 a Omn25; Omn7, Omn11, Omn16, Omn22, Omn23 a Omn24. Variabilita těchto 18 lokusů byla testována u 125 jedinců buňňáčka Monteirova. Alely se vyskytovaly v počtu 4–17 na lokus. Dále byla provedena *cross-species* PCR amplifikace u tří druhů trubkonosých: buňňáčka Bulwerova, modravého a buňňáčka madeirského, u kterého byla amplifikace díky příbuznosti buňňáčka madeirského a Monteirova, nejlépeší. Amplifikováno u něj bylo 18 lokusů a 17 z nich bylo vyhodnoceno jako polymorfní s alelovou četností 2–6 alel na lokus. U buňňáčka modravého bylo amplifikováno 6 lokusů, 2 z nich byly polymorfní s alelovou četností 3 a 6 alel na lokus. U buňňáčka Bulwerova bylo amplifikováno 7 lokusů a 3 z nich byly polymorfní s alelovou četností 2 alely na lokus.

3.6.3 Mikrosatelity od druhů z čeledi buňňákovití

Laboratoř populační genetiky disponuje celkem 100 páry primerů pro popsané mikrosatelitové lokusy, které byly izolovány od 9 druhů z čeledi buňňákovití: buňňáčka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), taiko (*Pterodroma magentae*), trinidadského (*P. arminjoniana*), havajského (*P. sandwichensis*), šedého (*Calonectris diomedea*), světlonohého, (*Puffinus carneipes*), baleárského (*P. mauretanicus*), Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) a útlozobého (*Pachyptila belcheri*).

Šest polymorfních dinukleotidových mikrosatelitových lokusů charakterizovali Techow *et O' Ryan* (2004) u buňňáčka bělobradého. DNA byla extrahovaná z tkáně buňňáčka bělobradého fenol-chloroformovou metodou, srážením ethanolem a štěpením proteinázou K. Následně byla z DNA pěti jedinců provedením PCR amplifikace s degenerovanými oligonukleotidovými primery zkonstruována genomová knihovna, která byla navíc obohacena o sekvence CA. Pomocí systému Promega pGEM-T Easy byly klonovány obohacené fragmenty. Bylo sekvenováno 21 rekombinantních plazmidů a 17 z nich obsahovalo mikrosatelitové lokusy, pro 10 vyhovujících byly pomocí softwaru DNAMAN (Lynnon BioSoft) navrženy primery. Těchto

10 lokusů bylo testováno na 68 jedincích buňáka bělobradého, 6 lokusů bylo polymorfních s počtem alel 3–9 na lokus. Následně byly tyto lokusy použity pro provedení *cross-species* PCR amplifikace u buňáka tristanského, obrovského, Hallova, albatrosa stěhovavého, černobrvého a šedohlavého. Nejlepšího výsledku při amplifikaci bylo dosaženo u lokusu Paequ2, protože byl amplifikován u všech testovaných druhů. U buňáka tristanského, albatrosa černobrvého, šedohlavého a stěhovavého byl lokus Paequ2 vyhodnocen jako polymorfní. Lokusy Paequ3 a Paequ10 byly polymorfní u všech druhů kromě albatrosa stěhovavého, u kterého tyto lokusy nebyly úspěšně amplifikovány. Mikrosatelitový lokus Paequ4 poskytl polymorfní produkt u buňáka obrovského a Hallova, u buňáka tristanského byl monomorfní a u ostatních druhů se neamplifikoval. Lokus Paequ7 byl polymorfní u buňáka tristanského a obrovského, u albatrosa stěhovavého amplifikací neposkytl žádný produkt. Lokus Paequ13 byl polymorfní u buňáka tristanského, albatrosa černobrvého a šedohlavého, u ostatních druhů nebyla jeho amplifikace úspěšná.

Gonzales *et al.* (2009) popsali 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů buňáka baleárského, který patří mezi kriticky ohrožené mořské ptáky. Dle Ostrander *et al.* (1992) a Hamilton *et al.* (1999) byly zkonstruovány genomové knihovny, které byly následně obohaceny o CA a AAAG repetice. Genomová DNA byla extrahována ze svalů, které byly konzervovány v ethanolu a štěpeny proteinázou K za provedení fenol-chloroformové metody, genomová DNA byla štěpena pomocí restrikčních enzymů *RsaI* a *XmnI* a ligována do pGEM-T Easy vektoru. Provedením chemiluminiscenčních metod (CDP-Star, Sigma) byly přibližně z 850 hybridizovaných transformovaných kolonií detekovány pozitivní kolonie. Pomocí univerzálních M13 primerů bylo na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems) a ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready sekvenováno 162 klonů a celkem 108 z nich obsahovalo mikrosatelitové lokusy. Bylo vybráno 23 lokusů a za využití softwaru Primer 3 byly navrženy primery, optimalizováno a amplifikováno bylo 19 lokusů. Testována byla genomová DNA 35 jedinců žijících na ostrově Cabrera a 20 jedinců na ostrově Eivissa, oba ostrovy patří do Baleár. Bylo zjištěno, že pouze 10 mikrosatelitových lokusů bylo polymorfních: Puff 1.5, Puff 1.9, Puff 4B, Puff C5A, Puff C5D, Puff G2C, Puff G2F, Puff G11F, Puff PM2 a Puff Sma6, na jednotlivých lokusech bylo detekováno 2–8 alel. Lokus Puff Sma6 byl vázán na pohlaví (na chromozomu W). Těchto 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů bylo dále využito pro *cross-species* PCR amplifikaci u 23 jedinců buňáka středomořského, 9 lokusů bylo polymorfních a byl získán podobný počet alel jako při amplifikaci u buňáka baleárského.

Brown *et al.* (2009) zkoumali populaci buňáka trinidadského a popsali 6 mikrosatelitových lokusů. Ze tří mrtvých jedinců, pocházejících z Kulatého ostrova, byly odebrány vzorky tkání, ze kterých byla fenol-chloroformovou extrakcí následně izolovaná DNA. Po konstrukci obohacené genomové knihovny, byly vybrány pozitivní klony a plazmidy

s vloženými inzerty byly sekvenovány pomocí M13 primerů a za využití Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Celkem bylo testováno 43 lokusů, ze kterých byly 3 vyhodnoceny jako polymorfní a 3 další lokusy byly polymorfní pouze pro jiné druhy, než buňáka trinidadského. Těchto 6 lokusů bylo testováno u 17 druhů z řádu trubkonosí a tučňáka žltorohého. Nejvyšší polymorfismus byl zaznamenán u lokusu Parm01, který se úspěšně amplifikoval u všech druhů s počtem alel 2–9. Lokus Parm02 se také amplifikoval u všech druhů, polymorfní produkt však poskytl pouze u 5 druhů, u kterých byl detekován počet alel 2–5. Lokus Parm03 byl polymorfní u 6 druhů s počtem alel 2–6, u 4 druhů neposkytl amplifikaci žádný produkt. Lokus Parm04 byl polymorfní u 4 druhů s počtem alel 2–4 a u 9 druhů se neamplifikoval. U lokusu Parm03 byl zaznamenán polymorfismus pouze u tří druhů s počtem alel 2–3 a kromě jednoho druhu, u kterého byl monomorfní, nebyla u dalších druhů jeho amplifikace úspěšná. Lokus Parm06 byl amplifikován u všech druhů, polymorfní produkt poskytl u 6 z nich s 2 alelami. Na *cross-species* PCR amplifikaci u buňáka trinidadského bylo testováno 53 již popsáných mikrosatelitových lokusů, pocházejících od jiných ptačích druhů: buňáka bělobradého, albatrosa stěhovavého, šedohlavého a kulíka mořského. Bylo zaznamenáno 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů: Paequ3, Paequ13 (Techow *et al.*, 2004), 10C5, 12H8 (Dubois *et al.*, 2005), De11 (Burg, 1999) a Calex01 (Küpper *et al.*, 2007). Alely se vyskytovaly v počtu 2–5 na lokus.

Pro buňáka Bulwerova bylo ve studii Andris *et al.* (2010) charakterizováno 11 nových polymorfních dinukleotidových mikrosatelitových lokusů. Ze vzorků krve 91 jedinců buňáka Bulwerova, žijících na Azorských ostrovech, byla izolovaná DNA, která byla následně extrahovaná pomocí soupravy QIAamp Tissue Kit (QIAGEN). Z genomové knihovny, obohacené o repetice (TG)₁₀ a (TC)₁₀ byly za využití biotinem značených oligosond, streptavidinem potažených magnetických kuliček a kompetentních buněk JM09 izolovány mikrosatelitové lokusy. Provedením modifikované polymerázové řetězové reakce (PCR) byly pomocí sond TG₁₀, TC₁₀, AGE₁ a AGE₂ testovány rekombinantní klony (Dubois *et al.*, 2005), které byly dále sekvenovány a pro další analýzu bylo použito 25 lokusů obsahujících největší počet nepřerušovaných repetic. Lokusy byly nejprve amplifikovány jednotlivě, poté byly multiplexovány na skupiny: Bb2, Bb7, Bb20 a Bb22; Bb10, Bb11, Bb12, Bb21 a Bb23; Bb3 a Bb25. Z celkového počtu 25 mikrosatelitových lokusů byly všechny až na jeden polymorfní, z nich bylo však z důvodu výskytu problémů během amplifikace zachováno pouze 11. Frekvence výskytu alel se pohybovala v rozmezí 2–8 alel na lokus. Bylo zjištěno, že lokus Bb11 je vázán na pohlaví. Těchto 11 polymorfních mikrosatelitů bylo dále testováno na *cross-species* PCR amplifikaci u tří druhů z řádu trubkonosí: buňáka bělobradého, kde bylo pozorováno 6 polymorfních lokusů, modravého, kde byly polymorfní všechny lokusy až na jeden, který

nebylo možné amplifikovat a buňňáčka Monteirova, kde bylo polymorfních pouze 5 lokusů a 2 lokusy se neamplifikovaly.

Moodley *et al.* (2015) se zabývali studiem genetické struktury populace buňňáka útlozobého a dalších druhů, pomocí sekvenačních metod nové generace popsali 25 polymorfních mikrosatelitů, které byly dále využity i pro *cross-species* PCR amplifikaci blízkých i vzdálenějších druhů. Genomová DNA byla izolována z krve, peří a svalové tkáně 77 jedinců buňňáka útlozobého a celkem 355 jedinců dalších druhů: buňňáka antarktického, širokozobého, Salvinova, hrdliččího, modravého a buňňáčka Wilsonova z hnízdních kolonií na subantarktických ostrovech. DNA byla následně rozštěpena na segmenty o velikosti 300–800 bp a segmenty byly ligovány do ssDNA knihovny. Tyto fragmenty byly pomocí streptavidinem značených magnetických kuliček a biotinem značených oligonukleotidů obohaceny o repetitivní sekvence, poté byly sekvenačními metodami nové generace sekvenovány na platformě Roche 454, pomocí programu Primer 3 byly pro sekvence navrženy primery. Pomocí třiceti šesti navržených párů primerů bylo 36 lokusů PCR amplifikací testováno na polymorfismus a u 4 nepříbuzných jedinců buňňáka útlozobého a 3 jedinců buňňáka holubího byly tyto primery použity pro *cross-species* PCR amplifikaci. Dvacet šest polymorfních mikrosatelitových lokusů bylo dále testováno na 77 jedincích buňňáka útlozobého. U jednoho z lokusů (Pacbel_00829) byla zjištěna významná vazba s dalšími lokusy (Pacbel_03731 a Pacbel_08509), nebyl tedy dále analyzován. Locus Pacbel_03731 vykazoval nejvyšší polymorfismus, u 74 jedinců bylo detekováno 48 alel. Tento locus vykazoval nejvyšší polymorfismus i při testování na *cross-species* PCR amplifikaci u buňňáka holubího, modravého, širokozobého, hrdliččího, Salvinova a buňňáčka Wilsonova, kdy bylo u 75 jedinců detekováno 51 alel.

5. Materiál a metody

5.1. Biologický materiál

Jako biologický materiál v praktické části bakalářské práce byly použity vzorky krve 6 nepříbuzných jedinců čápa černého (*Ciconia nigra*). Čápi pocházeli z chovu ze Safari Parku Dvůr Králové, krev byla odebrána jejich pracovníky. Z krve byla vedoucím bakalářské práce pomocí fenol-chloroformové metody vyizolovaná genomická DNA, která byla následně zředěna TE pufrům a její výsledná koncentrace činila $10 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.2. Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza ($5 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $400 \mu\text{l}$ každého), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachner)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N' - methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED) (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Rain off - tekuté stěračce (Sheron)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (Applichem)

5.3. Použité roztoky

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

- **Reakční pufru pro PCR, 10x:**
 - 1,211 g trishydroxymethylaminometanu
 - 80 ml deionizované vody
 - Upravit pH pomocí HCl na hodnotu 9,0
 - 3,73 g KCl
 - 1 ml Triton X-100
 - Rozpustit a doplnit do 100 ml
- **Roztok 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu:**
 - 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
 - 3 μ l 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu
- **TBE pufr, 10x zásobní roztok:**
 - 55 g kyseliny borité
 - 108 g trishydroxymethylaminometanu
 - 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol·l⁻¹, pH 8,0
 - Doplnit do 1 l deionizovanou vodou
- **Vývojka**
 - 24 g uhličitanu sodného
 - 800 ml deionizované vody
 - Uchovat v chladničce
 - Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l thiosíranu sodného Na₂S₂O₃

5.4. Použité laboratorní přístroje

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

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

5.5. PCR amplifikace DNA čápa černého

Byla provedena PCR amplifikace genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců čápa černého (*Ciconia nigra*). Každá PCR reakce sestává z připravené reakční směsi s párem primerů a genomické DNA čápa černého.

1. Rozmrazit, zvortexovat a zcentrifugovat všechny složky PCR směsi.
2. Do 1,5ml mikroskopavky napipetovat složky PCR směsi dle Tabulky 1, směs zvortexovat a zcentrifugovat.

Tabulka 1 Složení PCR reakční směsi pro 6 vzorků.

Složka PCR směsi	Objem [μ l]
Deionizovaná voda	44,4
Reakční pufr pro PCR (10 \times)	6,7
Roztok MgCl ₂ (25 mmol \cdot l ⁻¹)	4,0
Roztok dNTPs (20 mmol \cdot l ⁻¹)	0,7
Primer F (10 μ mol \cdot l ⁻¹)	3,3
Primer R (10 μ mol \cdot l ⁻¹)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U \cdot μ l ⁻¹)	1,0

3. Do každé 0,2ml PCR mikroskopavky napipetovat multikanálovou pipetou 1 μ l genomické DNA čápa černého a následně přidat 9 μ l PCR reakční směsi.
4. Všechny 0,2ml PCR mikroskopavky o celkovém objemu 0,1 ml umístit do termocykleru a dle následujícího schématu nastavit teplotní program:

1. 94 °C: 5 min
 2. 94 °C: 30 s
 - 50 °C: 30 s
 - 72 °C: 30 s
 3. 72 °C: 7 min
- } 35 cyklů

Základní nastavená teplota *annealingu* 50 °C byla použita u prvního testování všech párů primerů, v průběhu opakovaného testování byly podmínky PCR amplifikace optimalizovány změnou teploty *annealingu* pro jednotlivé páry primerů.

Cross-species PCR amplifikací bylo testováno celkem 213 párů primerů, 207 párů primerů bylo navrženo pro PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů izolovaných z řádu trubkonosí (Procellariiformes), 5 pro zástupce řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes): kulíka mořského, racka novozélandského a alkouna obecného a 1 pro lesňáčka žlutého z řádu pěvců (Passeriformes). Všechny testované mikrosatelitové lokusy včetně jejich zdrojového druhu a literárního zdroje jsou uvedeny v Tabulce 2–5.

Tabulka 2 Seznam mikrosatelitových lokusů od druhů z čeledi albatrosovití, které byly testovány na polymorfismus u čápa černého.

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

Tabulka 3 Seznam mikrosatelitových lokusů od druhů z čeledi buňňákovití, které byly testovány na polymorfismus u čápa černého.

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

Tabulka 4 Seznam mikrosatelitových lokusů od druhů z čeledi buňáčkovití, které byly testovány na polymorfismus u čápa černého.

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

Tabulka 5 Seznam mikrosatelitových lokusů od druhů z řádu dlouhokřídli a pěvci, které byly testovány na polymorfismus u čápa černého.

Řád	Čeď	Zdrojový druh	Název mikrosatelitového lokusu	Literární zdroj
	Alkovití	Alkoun obecný (<i>Cephus guillemots</i>)	Cco5-21	Friesen <i>et al.</i> , 2006
Dlouhokřídli	Kulíkovití	Kulík mořský (<i>Charadrius alexandrinus</i>)	Calex-01	Brown <i>et</i> Jordan, 2009 podle Küpper <i>et</i> <i>al.</i> , 2007
	Rackovití	Racek novozélandský (<i>Larus novaehollandiae scopulinus</i>)	RBG18, RBG18M, RBG29	Lawrence, 2008, Welch <i>et</i> Fleischer, 2011 podle Given <i>et</i> <i>al.</i> , 2002

Tabulka 5 Pokračování.

Řád	Čeď	Zdrojový druh	Název mikrosatelitového lokusu	Literární zdroj
Pěvci	Lesňáčkovití	Lesňáček žlutý (<i>Dendroica petechia</i>)	Dpμ01	Friesen <i>et al.</i> , 2006 podle Dawson <i>et al.</i> , 1997

5.6. Elektroforetická separace

Pro elektroforetickou separaci provedenou za denaturujících podmínek byl použit 6% polyakrylamidový gel, který byl nalit mezi skla o rozměrech 330 × 390 mm a 330 × 420 mm. Tloušťka gelu byla 0,4 mm. Separace probíhala ve vyhřívané sekvenační komůrce S2 Whatman Biometra.

1. Malé i velké sklo umýt 2× deionizovanou vodou a utřít papírovou utěrkou, poté obě skla umýt 96% ethanolem a opět utřít papírovou utěrkou.
2. Na plochu velkého skla, která se bude dotýkat gelu, nanést přípravek pro odpuzování vody Rain-off a důkladně rozetřít, nechat 5 min působit, poté 2× umýt deionizovanou vodou a utřít papírovou utěrkou.
3. Malé sklo umístit do digestoře a důkladně po celé ploše, která se bude dotýkat gelu, ošetřit 1 ml roztoku 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Nechat 5 minut působit a poté 4× omýt ethanolem, opět vysušit papírovou utěrkou.
4. Do digestoře přemístit i velké sklo a na okraje delších stran skla ošetřené plochy umístit spacers. Na velké sklo položit malé sklo ošetřenou plochou dolů tak, aby se kratší strana malého skla těsně dotýkala gum spacerů. Skla sepnout v místě spacerů na obou delších stranách dvěma klipsy.
5. Připravit 6% polyakrylamidový gel v kádince, důkladně promíchat a poté ho opatrně nalévat do prostoru mezi kratšími stranami skel, který je ohraničen gumami spacerů. V průběhu nalévání gelu druhou rukou poklepávat na sklo, aby se zamezilo vzniku bublin.
6. Jakmile je gelem vyplněn celý prostor mezi skly, vsunout do místa mezi spacersy cca 0,5 cm hluboko hřebínek a skla v místě hřebínku sepnout 4 klipsy. Gel ponechat hodinu polymerizovat.
7. Po ztuhnutí gelu, odstranit klipsy, sklo očistit kartáčkem od zbytků gelu. Zvláštní pozornost věnovat místu, kde byl zasunut hřebínek. Očištěné a usušené sklo umístit do elektroforetické komůrky stranou malého skla blíže k hliníkové desce elektroforetické komůrky. Po obou stranách skla pečlivě upevnit utáhnutím šroubovacích úchyťů.

8. Do prostoru kladné i záporné elektrody nalít $0,5 \times$ TBE pufr, opatrně vytáhnout hřebínek a proudem pufru z injekční stříkačky vyčistit prostor, odkud byl hřebínek vytažen. Elektroforetickou komůrku v obou prostorech uzavřít a zasunutím elektrod propojit elektroforetickou komůrku se zdrojem stejnosměrného elektrického proudu. Jako limitní faktor nastavit hodnotu výkonu 90 W, hodnotu elektrického napětí 3000 V a proudu 150 mA. Gel nechat 30 minut nahřát.
9. Během nahřívání připravit smícháním PCR produktu s 5 μ l nanášecího pufru vzorky, které před nanesením do gelu vložit na 3 minuty do denaturačních podmínek v termocykleru. Poté vzorky ihned vložit do ledové tříště, aby nedošlo k renaturaci vláken DNA produktů.
10. Vypnout zdroj stejnosměrného proudu, odpojit elektrody, otevřít prostor záporné elektrody elektroforetické komůrky a opět proudem pufru z injekční stříkačky vyčistit prostor mezi skly. Mezi skla opatrně asi 0,5–1 mm hluboko do gelu zasunout hřebínek. Pomocí multikanálové pipety pomalu mezi zoubky nanášet 2 μ l připravených vzorků. Po nanesení všech vzorků opět uzavřít prostor a zasunutím elektrod propojit elektroforetickou komůrku se zdrojem stejnosměrného elektrického proudu, jako limitní faktor výkonu nastavit 70 W, hodnotu elektrického napětí 3000 V a hodnotu elektrického proudu 150 mA.
11. V průběhu elektroforetické separace připravit fix/stop roztok, 1% HNO_3 a vývojku, kterou po protřepání uchovat v ledničce.
12. Po 1,5–3 hod. v závislosti na relativní molekulové hmotnosti vypnutím zdroje stejnosměrného elektrického proudu ukončit elektroforetickou separaci, odpojit elektrody a vypustit pufr. Z elektroforetické komůrky vytáhnout skla a položit je na vodorovnou podložku menším sklem nahoru a vyjmout spacery. Skla od sebe oddělit nožem a menší sklo umístit do fotomisky přilepeným gelem nahoru.
13. Fotomisku umístit na třepačku, zalít fix/stop roztokem a nechat působit po dobu 20 min. Poté slít fix/stop roztok nálevkou zpět do baňky a sklo s gelem $3 \times$ promýt deionizovanou vodou ve fotomisce.
14. Fotomisku znovu umístit na třepačku, nalít roztok 1% HNO_3 a nechat působit 4 minuty. Poté roztok vylít do odpadu a sklo s gelem $4 \times$ promýt deionizovanou vodou ve fotomisce.
15. Sklo s gelem přemístit do další fotomisky na třepačku a zalít roztokem AgNO_3 s těsně předem přidanými 1,2 ml formaldehydu a nechat působit 30 minut.
16. Roztok AgNO_3 slít nálevkou zpět do baňky, sklo s gelem umístit na 5 sekund do čisté fotomisky s deionizovanou vodou. Poté sklo s gelem přemístit do další připravené fotomisky a zalít vývojkou s těsně předem přidanými 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

17. Na třepačce pozorovat vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených pruhů PCR produktů, jakmile jsou pruhy dostatečně výrazné a ještě nevystupuje tmavé pozadí, zalít gel ve fotomisce fix/stop roztokem, nechat přibližně 2 minuty působit. Sklo s gelem přemístit na 2 min do deionizované vody, nechat okapat a umístit do sušárny vyhřáté na 90 °C.
18. Po vysušení gel vyhodnotit na negatoskopu a naskenovat do počítače.

6. Výsledky

V rámci vypracování experimentální části bakalářské práce jsem v Laboratoři populační genetiky pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovala celkem 213 párů primerů a hledala jsem polymorfni mikrosatelitové lokusy u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého (*Ciconia nigra*). Z celkového počtu 213 párů primerů pocházelo 207 párů primerů od druhů z řádu trubkonosí: 53 od druhů z čeledi albatrosovití, 100 od druhů z čeledi buňňákovití a 54 od druhů z čeledi buňňáčkovití. Dalších 5 párů primerů pocházelo od druhů z řádu dlouhokřídlí: alkouna obecného, kulíka mořského a racka novozélandského a 1 od lesňáčka žlutého z řádu pěvci.

Nejprve jsem provedla *cross-species* PCR amplifikaci všech 213 mikrosatelitových lokusů při základní teplotě *annealingu* 50 °C a nechala jsem po dobu 90 min probíhat separaci PCR produktů v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek. Na základě vizualizace výsledků jsem upravovala složení PCR směsi, teplotu *annealingu* pro jednotlivé páry primerů a délku separace. Pokud nevznikl žádný nebo vznikl velmi slabě viditelný produkt, teplotu *annealingu* jsem snižovala až na 44 °C, jestliže ani při této teplotě mikrosatelitový lokus neposkytl viditelný produkt, nebyl již dále testován. V opačném případě, kdy vznikl velmi výrazný a špatně hodnotitelný produkt, jsem postupně zvyšovala teplotu *annealingu* až na 68 °C. U jednoho mikrosatelitového lokusu (Omn 8) jsem zvýšila původní koncentraci hořečnatých iontů z 1,58 mmol·l⁻¹ o ¼ na koncentraci 1,98 mmol·l⁻¹, to spočívalo ve zvýšení pipetovaného objemu roztoku chloridu hořečnatého ze 4 na 5 µl. O stejný objem (1 µl) jsem snížila pipetovaný objem deionizované vody, aby zůstal zachován celkový objem PCR reakční směsi.

Polymorfni produkt poskytlo 16 mikrosatelitových lokusů. Charakteristika testovaných párů primerů a jimi amplifikovaných 16 polymorfni lokusů je uvedena v Tabulce 6. U sedmi párů primerů: De33, Tch6, PcD103, Puff 1.9, Puff 4B, Oc63, PcD109 jsem ani po úpravách podmínek PCR reakce nezískala žádný produkt. Ostatních 190 mikrosatelitových lokusů bylo monomorfni.

Tabulka 6 Charakteristika 16 polymorfních lokusů amplifikovaných u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého. V tabulce je uveden název mikrosatelitového lokusu včetně kódu z databáze GenBank, zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel (N), doba elektroforetické separace (t_s) a teplota *annealingu* (T_a). Hvězdička (*) značí o ¼ vyšší koncentraci hořčičných iontů v PCR reakční směsi (1,98 mmol·l⁻¹ místo původní koncentrace 1,58 mmol·l⁻¹).

Lokus (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	N	t_s [min]	T_a [°C]
11H7 (AY945753)	Albatros stěhovavý	F: GCAAGCTAAGTTGGGGGTAA R: ACAGTAGGGCTGCTGCAGAT	AC	4	180	60
10C5 (AY945750)		F: TGGAGATGCAATTGCCTAGA R: CAGATGAGGTTTTGGCCAGT	GA/GC	4	90	58
11F3 (AY945751)		F: TTTCCAGCACATTCCAACAA R: GTTCAGCCAGAAAAGCAAGC	GA/GT	2	180	58
D6 (AF096791)	Albatros stěhovavý, albatros šedohlavý	F: TGGTTTGCTTCCCTCACTTC R: TTTGTCTCAGGGAAACAGGG	TC	2	90	56
Dc 21 (AF096802)	Albatros šedohlavý	F: CGGGGGAAGTGAAGAAGATT R: TGGACAGCCAGTGGGATAAC	CA	2	90	53
STAL8 (neuvedeno)	Albatros bělohřbetý	F: CCCTGCTGGGTTTCATTTTC R: CATTGTGCAGTAGGCATGG	TG	2	90	51

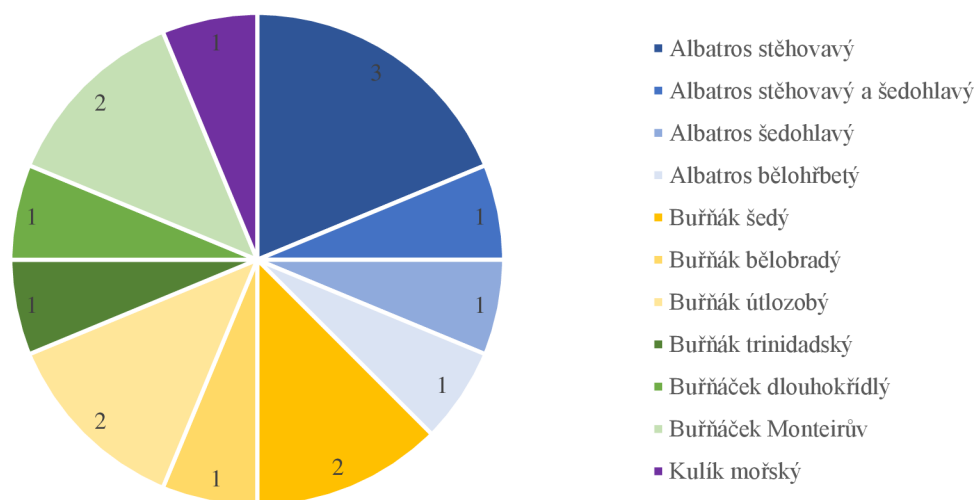
Tabulka 6 Pokračování 1.

Lokus (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	N	t_s [min]	T_a [°C]
Cd3 (EU029085)	Buňák šedý	F: TTGCCTCTTTTACAGGACTGC R: TCCCTGTGGCTAAGGATCTG	GT/CT	2	90	64
Cd4 (EU029086)		F: AAAGCTTTAAGCAGCGTTCC R: AAGAGAAGCCAACATTGTGAAA	CA	2	180	51
Paequ10 (nevedeno)	Buňák bělobradý	F: GAAGCTGCACTGGAAGTGC R: CATGTGGTAAGAATCCAGATG	CA	2	90	53
Pacbel_19907 (nevedeno)	Buňák útlozobý	F: TTTCTCCTTAGCTCGGCAGG R: CCATACTTGGTGGCAGTGTG	AG	2	90	50
Pacbel_16989 (nevedeno)		F: TGCTTTTGGACAATGTGGAGG R: TCTGGTACACTTCTCATTGGAC	CA	3	90	50
Parm03 (EU360819)	Buňák trinidadský	F: CTTGCTGGGTTTTGTTGGTT R: AATTGCTCAGGGAGG TGCT	CA/TA	2	90	56
Ole 26 (FR696402)	Buňáček dlouhokřídý	F: TCAGCTTCTGGTGCAGTTATG R: TCCTGCTGATGGATAGGTTATG	TG	2	90	66
Omn8* (JQ303232)	Buňáček Monteirův	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTA	AC	3	90	50

Tabulka 6 Pokračování 2.

Lokus (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	N	t_s [min]	T_a [°C]
Omn25 (JQ303242)	Buňáček Monteirův	F: TCTGCTCCCCCTGATTATTG R: ACTCTGAGAGCCATCCATCA	ATGG	2	120	48
Calex-01 (AM072445)	Kulík mořský	F: CTTCTCCATTGTTGTCACCTCCAGT R: GTTTCTTCTTGACTTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT/GA/GC	3	90	68

Provedením *cross-species* PCR amplifikace jsem hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého (*Ciconia nigra*). Z celkem 213 amplifikovaných mikrosatelitových lokusů, poskytlo polymorfní produkt 16 z nich. Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa černého činí 7,51 %. Z 16 polymorfních mikrosatelitových lokusů pocházelo 15 od druhů řádu trubkonosí a 1 od kulíka mořského z řádu dlouhokřídlí. Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace v rámci řádu trubkonosí činí 7,25 % a nejvíce amplifikovaných polymorfních lokusů pocházelo od zástupců čeledi albatrosovití a buňňákovití. Z celkového počtu 53 amplifikovaných lokusů z čeledi albatrosovití bylo 6 polymorfních a úspěšnost amplifikace polymorfního lokusu činila 11,32 %. Z čeledi buňňákovití pocházelo 100 mikrosatelitů a 6 jich poskytlo polymorfní produkt, úspěšnost zde činila 6,00 %. Z čeledi buňňáčkovití pocházelo 54 mikrosatelitových lokusů a 3 z nich byly polymorfní, úspěšnost byla 5,56 %. Z řádu dlouhokřídlí pocházelo 5 mikrosatelitových lokusů a polymorfní produkt poskytl pouze 1 lokus, pocházející od kulíka mořského. Jediný amplifikovaný lokus, pocházející z řádu pěvci od lesňáčka žlutého poskytl monomorfní produkt. Přehled polymorfních mikrosatelitových lokusů rozdělených dle čeledí a druhů, od kterých pocházejí, je uveden na Obrázku 2.



Obrázek 2 Graf šestnácti polymorfních mikrosatelitových lokusů amplifikovaných u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého, rozdělených dle čeledí a druhů, od kterých pocházejí. Čísla v grafu udávají počet nalezených polymorfních lokusů u jednotlivých druhů a barevně jsou odlišeny čeledi: modře albatrosovití, žlutě buňňákovití, zeleně buňňáčkovití a fialově zástupce řádu dlouhokřídlí z čeledi kulíkovití.

U 16 amplifikovaných polymorfních lokusů jsem určila počet alel a genotypů. U dvou lokusů, pocházejících z čeledi albatrosovití, jsem detekovala 4 alely, u 1 lokusu z čeledi

buňňákovítí a 1 lokusu z čeledi buňňáčkovítí jsem detekovala po 3 alelách. Výskyt 3 alel byl zaznamenán také u 1 lokusu od zástupce řádu dlouhokřídli, kulíka mořského. U zbylých nalezených polymorfních lokusů jsem detekovala 2 alely. Dvoualelové lokusy vykazovaly 2 a 3 genotypy, tříalelové lokusy vykazovaly 3 a 4 genotypy a čtyřalelové lokusy 4 a 5 genotypů. Jednotlivé genotypy těchto 16 polymorfních mikrosatelitových lokusů jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 Genotypy 16 polymorfních mikrosatelitových lokusů amplifikovaných 16 páry primerů u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého. V tabulce je dále uveden název lokusu, zdrojový druh, počet alel (N) a počet genotypů (G).

Zdrojový druh	Název lokusu	N	G	Genotypy jedinců					
				1	2	3	4	5	6
Albatros stěhovavý	11H7	4	5	1/4	2/3	2/3	2/4	1/2	2/2
	10C5	4	4	1/4	1/1	1/4	1/3	1/3	2/3
	11F3	2	2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2
Albatros stěhovavý, albatros šedohlavý	D6	2	2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1
Albatros šedohlavý	Dc21	2	2	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Albatros bělohřbetý	STAL8	2	3	1/2	2/2	1/2	1/1	2/2	2/2
Buňňák šedý	Cd3	2	3	1/1	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2
	Cd4	2	2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Buňňák bělobradý	Paequ10	2	2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Buňňák útlozobý	Pacbel_19907	2	3	1/2	1/2	1/2	1/1	1/2	2/2
	Pacbel_16989	3	4	2/3	1/2	1/3	2/2	1/3	2/2
Buňňák trinidatský	Parm03	2	2	1/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1
Buňňáček dlouhokřídli	Ole26	2	2	1/1	1/2	1/1	1/2	1/2	1/1
Buňňáček	Omn8	3	3	2/2	2/2	2/2	1/2	1/3	1/2
Monteirův	Omn25	2	2	1/2	2/2	1/2	1/2	2/2	1/2
Kulík mořský	Calex-01	3	3	2/2	2/2	2/3	2/2	2/3	1/2

Jako příklad uvádím několik elektroforeticky separovaných PCR produktů vybraných polymorfních mikrosatelitových lokusů nalezených u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého. Vzhledem k tomu, že ne všechny polymorfní mikrosatelitové lokusy byly zřetelně a snadno hodnotitelné, na obrázcích 3–6 jsem znázornila některé dobře hodnotitelné mikrosatelitové lokusy: STAL8, Cd3, Paequ10 a Dc21, u kterých byly detekovány 2 alely.



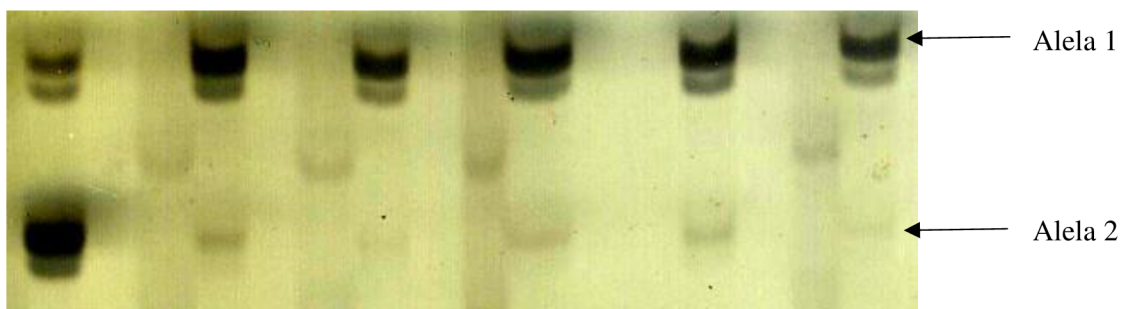
Obrázek 3 Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu STAL8. Šipkami jsou označeny 2 alely detekované u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého při teplotě *annealingu* 51 °C a délce separace 90 min.



Obrázek 4 Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Cd3. Šipkami jsou označeny 2 alely detekované u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého při teplotě *annealingu* 64 °C a délce separace 90 min.



Obrázek 5 Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Paequ10. Šipkami jsou označeny 2 alely detekované u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého při teplotě *annealingu* 53 °C a délce separace 90 min.



Obrázek 6 Elektroforeticky separované PCR produkty polymorfního mikrosatelitového lokusu Dc21. Šípkami jsou označeny 2 alely detekované u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého při teplotě *annealingu* 53 °C a délce separace 90 min.

7. Diskuze

V rámci experimentální části mé bakalářské práce jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace hledala polymorfni mikrosatelitové lokusy u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého. Celkem jsem testovala 213 párů primerů, z nich bylo 207 párů primerů navrženo pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů pocházejících od zástupců řádu trubkonosí, 5 od zástupců řádu dlouhokřídli a 1 od zástupce řádu pěvci. Celkem jsem našla 16 polymorfni mikrosatelitových lokusů.

Z celkového počtu 53 párů primerů, pocházejících od čeledi albatrosovití, které jsem v laboratoři měla k dispozici, poskytlo 6 z nich polymorfni produkt: 11H7, 10C5 a 11F3, pocházející od albatrosa stěhovavého, D6, pocházející od albatrosa stěhovavého a šedohlavého, Dc21, pocházející od albatrosa šedohlavého a STAL8, pocházející od albatrosa bělohřbetého.

Dubois *et al.* (2005) charakterizovali celkem 10 polymorfni mikrosatelitových lokusů u albatrosa stěhovavého. Autoři testováním 20 jedinců při jednotné teplotě 58 °C detekovali u lokusu 11H7 10 alel a lokusu 10C5 a 11F3 3 alely. U šesti nepříbuzných jedinců čápa černého jsem při teplotě 60 °C u lokusu 11H7 zaznamenala přítomnost 4 alel, u lokusu 10C5 jsem při teplotě 58 °C detekovala 4 alely a u lokusu 11F3 při teplotě 58 °C 2 alely.

Burg (1999) izolovala a charakterizovala celkem 26 polymorfni mikrosatelitových lokusů u albatrosa stěhovavého a šedohlavého. Lokus D6 vyhodnotila jako monomorfni, u lokusu Dc21 při teplotě 48 °C našla 4 alely u 50 jedinců albatrosa černobrvého, 1 alelu u albatrosa šedohlavého a 3 alely u albatrosa stěhovavého. Testováním 6 nepříbuzných jedinců čápa černého jsem u lokusu D6 při teplotě 56 °C a lokusu Dc21 při 53 °C shodně detekovala po 2 alelách.

Hernandez *et al.* (2014) popsali 15 mikrosatelitových lokusů u albatrosa severního. Při teplotě 60 °C autoři u lokusu STAL8 detekovali 1 alelu u 36 jedinců albatrosa černonohého a 12 jedinců albatrosa laysanského, u 3 jedinců albatrosa bělohřbetého detekovali 2 alely. Amplifikací tohoto lokusu u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého jsem při teplotě *annealingu* 51 °C získala polymorfni produkt se 2 alelami.

Dále jsem měla k dispozici 100 párů primerů, navržených pro mikrosatelitové lokusy, pocházející od druhů z čeledi buňňákovití. Pouze 6 lokusů: Cd3 a Cd4, pocházející od buňňáka šedého, Pacqu10 od buňňáka bělobradého, Pacbel_19907 a Pacbel_16989 od buňňáka útlozobého, Parm03 od buňňáka trinidadského, poskytlo amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého polymorfni produkt.

Bried *et al.* (2007) našli 11 polymorfních mikrosatelitů u 43 jedinců buňáka šedého. Autoři amplifikovali lokus Cd3 u 43 jedinců při teplotě 58 °C a detekovali 5 alel, u lokusu Cd4 autoři amplifikaci za stejných podmínek detekovali 2 alely. Amplifikaci těchto dvou lokusů u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého jsem získala polymorfni produkt a u obou jsem detekovala 2 alely. Teplota *annealingu* u lokusu Cd3 byla 64 °C a u lokusu Cd4 51 °C.

Techow *et al.* Ryan (2004) u buňáka bělobradého charakterizovali 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Amplifikaci lokusu Paeq10 u 69 jedinců při teplotě *annealingu* 55 °C autoři zaznamenali výskyt 7 alel. Tento lokus jsem amplifikovala u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého a při teplotě *annealingu* 53 °C jsem detekovala 2 alely.

Moodley *et al.* (2015) charakterizovali 25 mikrosatelitových lokusů u buňáka útlozobého. Autoři použili 2 různé teploty *annealingu*, kdy 30 cyklů probíhalo za teploty 56 °C a 8 cyklů za teploty 53 °C. Lokus Pacbel_19907 testovali u 74 jedinců a detekovali 8 alel, lokus Pacbel_16989 testovali u 75 jedinců a detekovali 10 alel. Oba lokusy jsem amplifikovala při teplotě *annealingu* 50 °C, u lokusu Pacbel_19907 jsem detekovala 2 a u lokusu Pacbel_16989 3 alely.

Brown *et al.* Jordan (2009) popsali 6 mikrosatelitových lokusů buňáka trinidadského. U šesti nepříbuzných jedinců čápa černého vykazoval polymorfismus jen lokus Parm03. Autoři amplifikaci tohoto lokusu při teplotě *annealingu* 55 °C detekovali 9 alel u 260 jedinců z Kulatého ostrova a 5 alel u 80 jedinců z ostrova Trinidad. Tento lokus autoři testovali u 17 druhů z řádu trubkonosí (od každého druhu 1–17 jedinců), u kterých detekovali 2–6 alel a tučňáka žlutorohého, u kterého detekovali 2 alely. Při teplotě *annealingu* 56 °C jsem u tohoto lokusu detekovala 2 alely.

Z celkového počtu 54 mikrosatelitových lokusů, pocházejících od druhů z čeledi buňáčkovití, pro které jsem měla v laboratoři k dispozici 54 párů primerů, poskytly polymorfni produkt 4 lokusy: Ole26 pocházející od buňáčka dlouhokřídleho, Omn8 a Omn25 od buňáčka Monteirova.

Bicknell *et al.* (2011) popsali u buňáčka dlouhokřídleho 26 polymorfních mikrosatelitových lokusů. U šesti nepříbuzných jedinců čápa černého jeden z lokusů: Ole26 poskytl polymorfni produkt. Autoři tento lokus testovali u 22 samců a 25 samic buňáčka dlouhokřídleho a v obou případech při teplotě *annealingu* 60 °C detekovali 2 alely. Tento lokus jsem testovala při teplotě *annealingu* 66 °C a detekovala jsem 2 alely.

Bried *et al.* (2012) charakterizovali 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů u buňáčka Monteirova. Z těchto lokusů, testovaných na 6 nepříbuzných jedincích čápa černého, poskytly polymorfni produkt lokusy Omn8 a Omn25. Testováním u 125 jedinců při jednotné

teplotě *annealingu* 58 °C autoři detekovali 10 alel u lokusu Omn8 a 5 alel u lokusu Omn25. U lokusu Omn8 jsem při teplotě *annealingu* 50 °C detekovala 3 alely a u lokusu Omn25 při teplotě 48 °C 2 alely.

Z řádu dlouhokřídli jsem celkem testovala 5 mikrosatelitových lokusů. Polymorfni produkt však poskytl pouze lokus Calex-01 pocházející od kulíka mořského. Tento lokus popsali Küpper *et al.* (2007), kdy u 42 jedinců při teplotě *annealingu* 62 °C detekovali 10 alel. Brown *et Jordan* (2009) provedli *cross-species* amplifikaci tohoto lokusu u 340 jedinců buňáka trinidadského při teplotě *annealingu* 55 °C a detekovali u něj 4 alely. Amplifikaci tohoto lokusu u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého při teplotě *annealingu* 68 °C jsem detekovala 3 alely.

Variabilitou mikrosatelitových lokusů se Laboratoř populační genetiky Univerzity Palackého v Olomouci zabývá téměř 15 let a bylo zde již odvedeno velké množství prací, jejichž náplní byla *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů, pocházejících od druhů z řádu trubkonosí u nepříbuzných jedinců různých ptačích druhů jako je například čáp černý, bílý a simbil, nesyť indomalajský, potápka roháč, pelikán bílý, africký, skvrnozobý, plameňák růžový, kadeřavý a karibský.

Nedvědová (2015) ve své diplomové práci provedla *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů z řádu trubkonosí u šesti nepříbuzných jedinců nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) a celkem 45 lokusů poskytlo polymorfni produkt s počtem alel 2–5. Celkem 7 lokusů: 11H7, 10C5, Pacbel_19907, Ole26, Omn8, Omn25 a Calex-01 se shodovalo s polymorfními mikrosatelitovými lokusy amplifikovanými u šesti nepříbuzných jedinců v mé práci.

Janušová (2015) ve své bakalářské práci provedla *cross-species* PCR amplifikaci u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) a našla 20 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Tyto polymorfní mikrosatelitové lokusy následně charakterizovala na 13 jedincích potápky roháče ve své diplomové práci (Janušová, 2017) a polymorfismus vykazovalo 17 z nich. V porovnání s polymorfními mikrosatelitovými lokusy nalezenými u čápa černého byly společné 3 z nich.

Strejšková (2016) ve své bakalářské práci provedla *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů u šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) od druhů z řádu trubkonosí a našla 50 polymorfních lokusů s 2–5 alelami. Na svou práci navázala diplomovou prací, kde polymorfní mikrosatelitové lokusy dále testovala na 30 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského, kdy polymorfni produkt poskytlo jen 45 lokusů

s alelami v počtu 2–11. V porovnání s polymorfními mikrosatelitovými lokusy, které jsem našla u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého, byl společný pouze lokus Omn8.

Verešová (2018) ve své bakalářské práci provedla *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů z řádu trubkonosí u 6 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) a celkem 12 mikrosatelitových lokusů poskytlo polymorfní produkt a byly detekovány 2–3 alely. Pouze lokus Calex-01 se shodoval s polymorfními mikrosatelitovými lokusy nalezenými u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého v mé práci

Kopečná (2018) ve své bakalářské práci pomocí *cross-species* PCR amplifikace hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy od trubkonosých u šesti nepříbuzných jedinců u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Nalezla celkem 24 polymorfních mikrosatelitových lokusů, na kterých detekovala 2–3 alely. Tři lokusy: Ole26, Omn8 a Cd3 poskytly v mé práci amplifikaci u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého polymorfní produkt.

Hudzieczková (2019) provedla *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů z řádu trubkonosí u šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a našla celkem 46 polymorfních mikrosatelitových lokusů s 2–6 alelami. U pěti z nich: Cd3, Cd4, Ole26, Omn8 a Calex-01 jsem ve své práci amplifikaci u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého také získala polymorfní produkt.

Zlochová (2019) ve své diplomové práci provedla *cross-species* PCR amplifikaci 64 mikrosatelitových lokusů z řádu trubkonosí u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Z nich 48 bylo v dřívější bakalářské práci (Kůrová, 2017) při testování u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového označeno jako polymorfní. Zbylých 16 vyhodnotila jako polymorfní Strejčková (2018) u 30 jedinců plameňáka karibského. Z celkového počtu 64 retestovaných lokusů, poskytlo 43 z nich polymorfní produkt s 2–3 alelami na lokus. Dva lokusy se shodovaly s polymorfními mikrosatelitovými lokusy nalezenými v mé bakalářské práci.

Krňávková (2021) provedla *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů z řádu trubkonosí u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého (*Ciconia ciconia*) a celkem 18 mikrosatelitových lokusů poskytlo polymorfní produkt. Dva lokusy byly společné s polymorfními mikrosatelitovými lokusy u čápa černého v mé práci.

Macková (2021) *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů z řádu trubkonosí u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) našla 22 polymorfních lokusů, u kterých detekovala 2–5 alel. Tři lokusy: Dc21, Omn8 a Calex-01 poskytly polymorfní produkt i v mé práci amplifikaci u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého.

Kopecký (ústní sdělení) ve své bakalářské práci, která probíhala současně s mou nalezl u čápa simbila (*Ciconia abdimii*) 26 polymorfních lokusů s 2–6 alelami. Šest lokusů: Omn8, Calex-01, 11H7, Omn25, Pachel_19907 a Pachel_16989 se shodovalo s polymorfními mikrosatelitovými lokusy nalezenými v mé práci.

Šestnáct polymorfních mikrosatelitových lokusů, které jsem ve své práci testovala u šesti nepříbuzných jedinců čápa černého, jsem následně v Tabulce 8 porovnávala s výsledky prací provedených v Laboratoři populační genetiky Univerzity Palackého v Olomouci v předchozích letech, ve kterých byly *cross-species* PCR amplifikací na polymorfní mikrosatelitové lokusy od řádu trubkonosí testovány jiné druhy.

Největší shodu jsem zaznamenala u nesyta indomalajského, se kterým čáp černý sdílel 7 polymorfních mikrosatelitových lokusů, dalších 6 lokusů se shodovalo s čápem simbil, 5 lokusů s pelikánem bílým, 3 lokusy s pelikánem africkým, pelikánem skvrnozobým a potápkou roháč a 2 s čápem bílým a plameňákem růžovým. Naopak nejmenší shodu jsem zaznamenala u plameňáka karibského a pelikána kadeřavého, se kterými se shodoval pouze 1 polymorfní mikrosatelitový lokus ze 14 porovnávaných. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u amplifikace mikrosatelitového lokusu Omn8, který vykazoval nejvyšší polymorfismus, poskytl polymorfní produkt u 10 z 11 testovaných druhů: nesyta indomalajského, čápa černého, bílého a simbila, plameňáka karibského, růžového, pelikána bílého, afrického a skvrnozobého a potápky roháče, to nikoliv zanedbatelně, ale s výskytem alel 3–8 na lokus. Tento lokus neposkytl polymorfní produkt pouze u pelikána kadeřavého. S čápem bílým, přestože se jedná o stejný rod, čáp černý sdílel pouze 2 polymorfní mikrosatelitové lokusy, jedním z vysvětlení by mohla být skutečnost, že v rámci rodu *Ciconia* jsou čáp černý a bílý nejvzdálenější druhy (Sheldon *et* Slikas, 1997) a Slikas (1997 a 1998).

V Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci byl čáp černý (*Ciconia nigra*) v rámci vypracování bakalářských a diplomových prací testován na *cross-species* PCR amplifikaci ve 3 pracích.

Navrátilová (2009) se ve své bakalářské práci zabývala *cross-species* PCR amplifikací mikrosatelitových lokusů pocházejících od různých druhů vodních ptáků z řádů brodiví, veslonozí, vrubozobí, potápky, tučňáci a tura domácího u 6 nepříbuzných jedinců čápa černého. Celkem testovala 174 mikrosatelitových lokusů a našla 21 polymorfních. Cahlíková (2011) provedla *cross-species* PCR amplifikaci celkem 218 mikrosatelitových lokusů, u 24 nepříbuzných jedinců čápa černého genotypovala polymorfní mikrosatelitové lokusy z předchozí bakalářské práce Navrátilová (2009) a potvrdila polymorfismus u 18 z nich.

Tabulka 8 Mikrosatelitové lokusy pocházející od zástupců řádu trubkonosí polymorfní u čápa černého, porovnané s polymorfními mikrosatelitovými lokusy u dalších druhů, na kterých v rámci Laboratoře populační genetiky byly mikrosatelitové lokusy od trubkonosých testovány. Jedná se o tyto druhy: čáp černý (tato práce), nesyt indomalajský (Nedvědová, 2015), čáp simbil (Kopecký, ústní sdělení), pelikán bílý (Hudzieczková, 2019), p. africký (Kopečná, 2020), potápka roháč (Janušová, 2017), pelikán skvrnozobý (Macková, 2021), plameňák růžový (Zlochová, 2019), čáp bílý (Krňávková, 2021), pelikán kadeřavý (Verešová, 2020), plameňák karibský (Strejčková, 2018), seřazené dle počtu společných polymorfních lokusů. Čísla značí počet detekovaných alel, M značí monomorfní produkt, v závorce je uveden počet testovaných jedinců.

Lokus	Testovaný druh										
	Čáp černý (6)	Nesyt indomalajský (6)	Čáp simbil (6)	Pelikán bílý (6)	Pelikán africký (12)	Potápka roháč (13)	Pelikán skvrnozobý (6)	Plameňák růžový (22)	Čáp bílý (6)	Pelikán kadeřavý (41)	Plameňák karibský (30)
Omn8	3	4	6	4	3	6	4	8	6	M	3
Calex-01	3	2	2	2	M	M	2	2	M	3	M
Ole26	2	3	M	2	2	M	M	M	M	M	M
Cd3	2	M	M	3	2	M	M	M	M	M	M
11H7	4	2	2	M	M	M	M	M	M	M	M
Omn25	2	2	3	M	M	M	M	M	M	M	M
Pacbel_19907	2	2	2	M	M	M	M	M	M	M	M
10C5	4	2	M	M	M	M	M	M	M	M	M
Cd4	2	M	M	2	M	M	M	M	M	M	M
Dc21	2	M	M	M	M	M	2	M	M	M	M
Pacbel_16989	3	M	2	M	M	M	M	M	M	M	M
Parm03	2	M	M	M	M	5	M	M	M	M	M
Paequ10	2	M	M	M	M	M	M	M	2	M	M
STAL8	2	M	M	M	M	2	M	M	M	M	M

Zjistila, že dva lokusy, které byly v předchozí práci označeny za polymorfní, jsou ve skutečnosti monomorfní, kdy k mylnému vyhodnocení došlo pravděpodobně výskytem extra PCR produktů, které ztěžovaly vyhodnocení, dále zjistila, že dva páry primerů amplifikovaly stejný lokus. Nalezla dalších 12 polymorfních mikrosatelitových lokusů a celkem tedy u 24 jedinců genotypovala 30 polymorfních mikrosatelitových lokusů. V bakalářské práci (Navrátilová, 2009) a diplomové práci (Cahlíková, 2011) bylo tedy dohromady testováno 381 párů primerů, navržených pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů od druhů řádů brodiví, dlouhokřídli, plameňáci, potáplice, vrubozobí a veslonozí. Celkem našly 30 polymorfních mikrosatelitových lokusů: 16 od zástupců řádu brodiví, 1 z řádu vrubozobí, 1 z řádu tučňáci, 8 z řádu veslonozí a 4 z řádu plameňáci. Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace u čápa černého byla 7,9 %.

Fišerová (2014) analyzovala a charakterizovala polymorfní *cross-species* mikrosatelitové lokusy u čápa černého, bílého a simbila. K amplifikaci DNA čápa černého použila 31 párů primerů, které byly navrženy pro čápa východního, volavku rusohlavou z řádu brodiví a potápku západní z řádu potápky. Žádný z použitých párů primerů při amplifikaci neposkytl polymorfní produkt.

Celkově včetně mé bakalářské práce bylo v rámci Laboratoře populační genetiky Univerzity Palackého v Olomouci u čápa černého na polymorfismus testováno 625 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů pocházejících od zástupců kladu Aequorlornithes. Z nich bylo celkem 46 polymorfních a úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace činí 7,36 %. Třicet lokusů bylo již charakterizováno na 24 nepříbuzných jedincích (Cahlíková, 2011) a 16 lokusů bylo zatím pouze nalezeno na 6 nepříbuzných jedincích v mé bakalářské práci a v budoucnu by měly být charakterizovány. V případě potřeby dalších polymorfních mikrosatelitových lokusů bych doporučila otestovat další dosud netestované mikrosatelitové lokusy od zástupců kladu Aequorlornithes. Vhodné by bylo testovat mikrosatelitové lokusy nejen od druhů, které již v minulosti polymorfní produkt poskytly (například čápi, pelikáni, plameňáci) (Feldman Turjeman, 2016), ale například od druhů z řádu dlouhokřídli (Charadriiformes), které zatím testovány nebyly, ale *cross-species* PCR amplifikací poskytl 1 z nich polymorfní mikrosatelit u jiného druhu z kladu Aequorlornithes, který byl polymorfní i u čápa černého (Brown *et* Jordan, 2009).

8. Závěr

V této bakalářské práci jsem provedla *cross-species* PCR amplifikaci šesti nepříbuzných jedinců čápa černého (*Ciconia nigra*) za použití celkem 213 párů primerů. Od druhů z řádu trubkonosí pocházelo 207 párů primerů: 53 párů primerů bylo navrženo pro mikrosatelitové lokusy od druhů z čeledi albatrosovití, 100 z čeledi buňákovití a 54 z čeledi buňáčkovití. Dalších 5 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů pro druhy z řádu dlouhokřídlí: alkouna obecného, kulíka mořského a racka novozélandského a 1 pár primerů pocházel od lesňáčka žlutého z řádu pěvců. Těchto 6 párů primerů bylo dříve úspěšně použito pro *cross-species* PCR amplifikaci některých druhů pocházejících z řádu trubkonosí.

Celkem 206 párů primerů poskytlo po amplifikaci na DNA šesti nepříbuzných jedinců čápa černého PCR produkt, u 7 párů primerů použitých při amplifikaci nebylo možné ani po upravení podmínek PCR reakce produkt získat. Bylo nalezeno 16 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Monomorfní produkt poskytlo 190 párů primerů. Všechny lokusy byly nejprve amplifikovány při teplotě *annealingu* 50 °C a 90 min separovány v 6% polyakrylamidovém gelu, případně byla teplota *annealingu* a délka separace pro každý lokus zvlášť upravována a u jednotlivých lokusů byly určeny genotypy. Počet detekovaných alel se pohyboval v rozmezí 2–4 na lokus. Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa černého celkově činí 7,51 % a v rámci řádu trubkonosí 7,25 %. Nejvíce nalezených polymorfních lokusů pocházelo od čeledi albatrosovití (7) a čeledi buňákovití (6).

9. Použitá literatura

Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuskript, dostupné online na: <https://www.yumpu.com/en/document/view/39976169/eighteen-polymorphic-microsatellite-markers-in-monteiros-storm->, navštíveno dne 18. 4. 2022.

Anonymous (2021): BirdLife International: *Ciconia nigra*. Dostupné online na: <http://www.birdlife.org>, navštíveno 20. 4. 2022.

Bicknell, A. W. J., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Knight, M. E., Bilton, D. T., Votier, S. C. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's stormpetrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). Conservation Genetics Resources, 3, 711–716.

Bried, J., Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuskript, dostupné online na: <https://www.yumpu.com/en/document/view/39976169/eighteen-polymorphic-microsatellite-markers-in-monteiros-storm->, navštíveno dne 18. 4. 2022.

Bried, J., Dubois, M. P., Jouventin, P., Santos, R. S. (2008): Eleven polymorphic microsatellite markers in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*, and cross-species amplification on threatened Procellariiformes. Molecular Ecology Resources, 8, 602–604.

Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009): Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. Journal of Ornithology, 150, 925–929.

Burg, T. M. (1999): Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. Molecular Ecology, 8, 338–341.

Burg, T. M., Croxall, J. P. (2001): Global relationships amongst black-browed and greyheaded albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. Molecular Ecology, 10, 2647–2660.

Burg, T. M., Croxall, J. P. (2004): Global population structure and taxonomy of the wandering albatross species complex. Molecular Ecology, 13, 2345–2355.

Černý, W. (1980): Ptáci. Artia, Praha.

- Dawson D. A., Horsburgh G., Küpper C., Stewart I. R. K., Ball A. D., Durrant K. L., Hansson B., Bacon II., Bird S., Klein Á., Krupa A. P., Lee J.-W., Martín-Galvéz D., Simeoni M., Smith G., Spurgin L. G., Burke T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*, 79, 506–514.
- Dubois, M. P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 905–907.
- Feldman Turjeman, S., Centeno–Cuadros, A., Nathan, R. (2016): Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite markers for the white stork, *Ciconia ciconia*: applications in individual–based and population genetics. *Animal Biodiversity and Conservation*, 39.1, 11–16.
- Fišerová, E. (2014): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), černého (*C. nigra*) a simbila (*C. abdimii*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Friesen, V. L., González, J. A., Cruz-Delgado, F. (2006): Population genetic structure and conservation of the Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Conservation Genetics*, 7, 105–115.
- Gaisler, J., Zima, J. (2018): Zoologie obratlovců. Academia, Praha.
- Given, A. D., Mills, J. A., Baker, A. J. (2002): Isolation of polymorphic microsatellite loci from the red-billed gull (*Larus novaehollandiae scopulinus*) and amplification in related species. *Molecular Ecology Notes*, 2, 416–418.
- Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwaters, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1044–1046.
- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K., Harshman, J., Huddleston, Ch. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, Ch. C., Yuri, T. (2008): A Phylogenetic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science*, 320, 1763–1767.
- Hamilton, M. B., Pincus, E. L., Di Fiore, A., Fleischer R. C. (1999): Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, 27, 501–507.

- Hancock, J. M. (1996): Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays*, 18, 421–425.
- Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2013): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources*, 5, 27–29.
- Hernandez, L. D., Lounsbury, Z. T., Collins, P. W., Henry, R. W., Newsome, S. D., Sacks, B. N. (2014): Development and characterization of 15 polymorphic microsatellite markers for North Pacific albatrosses using paired-end Illumina shotgun sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 6, 491–493.
- Hora, J., Kloubec, B., Šťastný, J. a kol. (2015): Ptáci jižních Čech, Jihočeský kraj, České Budějovice.
- Hudec, K., Šťastný, K. a kol. (2016): Fauna ČR, Ptáci 1, Academia, Praha.
- Hudzieczková, A. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Hutchins, M., Jackson, A. J., Bock, W. J., Olendorf, D., (Ed.) (2002): Grzimek's Animal Life Encyclopedia, Gale Group, Farmington Hills, MI.
- Janušová, D. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Janušová, D. (2017): Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorinithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kahl, M. P. (1971): Social behavior and taxonomic relationships of the storks. *Living Bird* 10, 151–170.
- Kahl, M. P. (1979): Family Ciconiidae: 'Peter Check List of Birds of the World'. Vol. 2 (Mayr, E., Cottrell, G. W. Eds). Museum of Comparative Zoologie, Cambridge.
- Kantartzi, S., K., (Ed.) (2013): Microsatellites: methods and protocols. *Methods in molecular biology*, v. 1006. Humana Press ; Springer, New York.
- Kopečná, K. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

- Kopečná, K. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Krňávková, P. (2021): Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Küpper, C., Horsburgh, G. J., Dawson, D. A., French-Constant, R., Szekely, T., Burke, T. (2007) Characterization of 36 polymorphic microsatellite loci in the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) including two sex-linked loci and their amplification in four other Charadrius species. *Molecular Ecology Notes*, 7, 35–39.
- Kůrová, V. (2017): Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Lawrence, H. A. (2008): Conservation genetics of the world's most endangered seabird, the Chatham Island tāiko (*Pterodroma magentae*). Dissertation. Auckland, New Zealand, dostupné online na <https://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>, navštíveno dne 20. 4. 2022.
- Macková, B. (2021): Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řád trubkonosí u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimanda, G. K., Thali, M. R., Alderman, R., Cuthbert, R. J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Phillips, R. A., Ryan, P. G., Suazo, C. G., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046–1058.
- Nedvědová, M. (2015): *Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (Mycteria leucocephala)*. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Møller, A. P., Ellegren, H. (1997): Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research*, 7, 471–482.

- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted nextgeneration DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153, 367–373.
- Sheldon, F. H., Slikas, B. (1997): Advances in Ciconiiformes Systematics 1976–1996. *Colonial Waterbirds* 20, 106–114.
- Sibley, Ch. G., Ahlquist, J. E., Monroe, Jr. B. L. (1988): A classification of the Living Birds of the World Based on DNA-DNA Hybridization Studies. *The Auk: Ornithological Advances*, 105, 409–423.
- Slikas, B. (1997): Phylogeny of the Avian Family Ciconiidae (Storks) Based on Cytochrome b Sequences and DNA-DNA Hybridization Distances. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8, 275–300.
- Slikas, B. (1998): Recognizing and Testing Homology of Courtship Displays in Storks (Aves: Ciconiiformes: Ciconiidae). *Society for the Study of Evolution*, 884–893.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řád trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Strejčková, B. (2018): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů od trubkonosých u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004) Characterization of microsatellite loci in Whitechinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes*, 4, 33–35.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Verešová, D. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Verešová, D. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) a u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

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

Winkler, D. W., S. M. Billerman, and I. J. Lovette (2020). Storks (Ciconiidae), dostupné online na: <https://doi.org/10.2173/bow.ciconi2.01>, navštíveno dne 18. 4. 2022.

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