

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2024**

**Bc. Ondřej Kopecký**

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



**Analýza a charakteristika vybraných polymorfních  
mikrosatelitů z řádu trubkonosí a tučňáci a konzervovaných  
ptačích mikrosatelitů u čápa simbila (*Ciconia abdimii*)**

**Diplomová práce**

**Bc. Ondřej Kopecký**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2024**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ondřej KOPECKÝ**  
Osobní číslo: **R220030**  
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa simbila (*Ciconia abdimii*).**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
3. Amplifikace a charakteristika mikrosatelitových lokusů na DNA 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfní v bakalářské práci Košatová (2020) a v bakalářské práci Kopecký (2022).

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Prum, R. O. *et al.* (2015): A comprehensive phylogeny of birds (*Aves*) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
2. Moodley, Y. *et al.* (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources* 15, 1046–1058.
3. Hardesty, B. D. *et al.* (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.
4. Vianna, J. A. *et al.* (2017): Comparative genome-wide polymorphic microsatellite markers in Antarctic penguins through next generation sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, 840, 676–687.
5. Dawson, D. A. *et al.* (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.

Vedoucí diplomové práce:

**RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.**

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: 3. listopadu 2022

Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

L.S.

---

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

---

**prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.**  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 4. listopadu 2022

## Bibliografické údaje

<b>Jméno a příjmení autora:</b>	Bc. Ondřej Kopecký
<b>Název práce:</b>	Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa simbila ( <i>Ciconia abdimii</i> )
<b>Typ práce:</b>	Diplomová
<b>Pracoviště:</b>	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
<b>Vedoucí práce:</b>	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce:</b>	2024

### Souhrn:

Tato diplomová práce se zaměřuje na analýzu a charakterizaci polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila, které byly u něj nalezeny pomocí *cross-species* PCR amplifikace.

Teoretická část této práce se soustředí na řád čápi, a to především na jeho systematiku a na cytogenetickou analýzu u zástupců z toho řádu, ale také na popis samotného čápa simbila. Další část je zaměřena na mikrosatelity, konkrétně na jejich původ, dynamiku a distribuci u ptáků. V poslední části jsou popsány doposud nalezené *de novo* polymorfní mikrosatelitní lokusy u druhů z řádu čápi.

Experimentální část se zabývá analýzou a charakterizací *cross-species* polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila, které byly nalezeny u tohoto druhu v pracích Košatová (2020) a Kopecký (2022). Tyto lokusy byly původně popsány u zástupců z řádu trubkonosí a tučňáci, ale také některé byly konzervované ptačí mikrosatelity. Navíc bylo v této práci nově otestováno 68 párů primerů pro mikrosatelity popsané u zástupců z kladu Aequorlornithes. Celkem bylo na 10 nepříbuzných jedincích čápa simbila charakterizováno 50 polymorfních mikrosatelitů na základě populačně-genetických parametrů a žádná dvojice mikrosatelitů nebyla ve vazbě. U těchto lokusů bylo nalezeno 2 až 12 alel.

<b>Klíčová slova:</b>	Čáp simbil, mikrosatelity, <i>cross-species</i> PCR amplifikace, <i>Ciconia abdimii</i> , trubkonosí, tučňáci, Sphenisciformes, konzervované ptačí mikrosatelity
<b>Počet stran:</b>	80
<b>Počet příloh:</b>	2
<b>Jazyk:</b>	Český

## **Bibliographical identification**

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

**Title:** The analysis and characterization of selected polymorphic microsatellites from the orders Procellariiformes and Sphenisciformes and conserved avian microsatellites in Abdim's stork (*Ciconia abdimii*)

**Type of thesis:** Master

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

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

**The year of presentation:** 2024

### **Summary:**

This master thesis focuses on the analysis and characterization of polymorphic microsatellite loci found in the Abdim's stork using cross-species PCR amplification.

The theoretical part of this thesis focuses on the order Ciconiiformes, especially on its systematics and cytogenetic analysis of species of this order, but also on the description of the Abdim's stork itself. The next part focuses on microsatellites, specifically their origin, dynamics and distribution in birds. The last section describes the *de novo* polymorphic microsatellites loci found so far in storks.

The experimental part deals with the analysis and characterization of cross-species polymorphic microsatellites loci in the Abdim's stork. These microsatellites have already been identified in this species by Kořatová (2020) and Kopecký (2022) and were originally described in species of the orders Procellariiformes and penguins, but some were also conserved avian microsatellites. In addition, 68 primer pairs were newly tested in this work for microsatellites that have been described in species of the clade Aequorlornithes. In total, 50 polymorphic microsatellites were characterized on 10 unrelated Abdim's storks based on population-genetic parameters, and no microsatellite pairs were linkage disequilibrium. Between 2 and 12 alleles were found at these loci.

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

**Number of pages:** 80

**Number of appendices:** 2

**Language:** Czech

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

V Olomouci dne 26. 4. 2024

.....

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



## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled</b> .....	<b>3</b>
3.1	Řád čápi .....	3
3.1.1	Fylogeneze a systematika kladu Aequornithes .....	3
3.1.2	Cytogenetická analýza u čápů .....	4
3.1.3	Ochrana čápů .....	6
3.2	Čáp simbil .....	6
3.3	Mikrosatelity .....	8
3.3.1	Geneze a zánik mikrosatelitů .....	8
3.3.2	Mutační dynamika mikrosatelitů .....	9
3.3.3	Distribuce mikrosatelitů u ptáků .....	10
3.4	Mikrosatelitní lokusy popsané u druhů z řádu čápi .....	11
3.4.1	Mikrosatelitní lokusy popsané u nesyta amerického .....	11
3.4.2	Mikrosatelitní lokusy popsané u čápa bílého .....	12
3.4.3	Mikrosatelitní lokusy popsané u čápa východního .....	13
3.5.4	Mikrosatelitní lokusy popsané u marabua afrického .....	15
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>16</b>
4.1	Biologický materiál .....	16
4.2	Seznam použitých chemikálií .....	16
4.3	Seznam použitých roztoků a jejich příprava .....	17
4.4	Seznam použitých laboratorních přístrojů .....	19
4.5	PCR amplifikace DNA čápa simbila .....	19
4.6	Amplifikované mikrosatelitní lokusy u čápa simbila .....	21
4.7	Elektroforetická separace PCR produktů .....	24
4.8	Statistické vyhodnocení experimentu .....	27
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>Diskuse</b> .....	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy</b> .....	<b>70</b>

## Seznam obrázků

<b>Obrázek č. 1:</b> Systém vodních a semi-vodních ptáků .....	4
<b>Obrázek č. 2:</b> Makrochromozomy z karyotypu samice čápa jabiru ( <i>J. mycteria</i> ) dle Seligmann <i>et al.</i> (2019).....	5
<b>Obrázek č. 3:</b> Čáp simbil ( <i>Ciconia abdimii</i> ) v Etiopii.....	7
<b>Obrázek č. 4:</b> Rozdělení 47 polymorfních mikrosatelitních lokusů analyzovaných u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila podle počtu alel .....	30
<b>Obrázek č. 5:</b> Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Ee18 testovaného u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila.....	38
<b>Obrázek č. 6:</b> Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Pf36 testovaného u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila.....	39
<b>Obrázek č. 7:</b> Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Ptero09 testovaného u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila .....	39
<b>Obrázek č. 8:</b> Procentuální zastoupení 99 polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila, vzhledem k jejich zdrojovému řádu .....	47
<b>Obrázek č. 9:</b> Úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů u čápa bílého, černého a simbila v rámci 7 zdrojových skupin, u nichž byly tyto lokusy původně popsány .....	48
<b>Obrázek č. 10:</b> Charakterizované polymorfní mikrosatelity pocházející od druhů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervované ptačí mikrosatelity, kdy tyto lokusy byly polymorfní u čápa bílého (Krňávková, 2023; Macková, 2023), černého (Musilová, osobní sdělení) a simbila (tato práce) .....	50

## Seznam tabulek

<b>Tabulka č. 1:</b> Počet chromozomů v diploidní sadě u 13 druhů z řádu čápi .....	5
<b>Tabulka č. 2:</b> Složení PCR reakční směsi pro 10 vzorků .....	20
<b>Tabulka č. 3:</b> Teplotní a časový profil PCR reakce.....	20
<b>Tabulka č. 4:</b> Přehled polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila popsanych v bakalářské práci Košatová (2020).....	21
<b>Tabulka č. 5:</b> Přehled polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila popsanych v bakalářské práci Kopecký (2022) .....	22
<b>Tabulka č. 6:</b> Přehled nově testovaných mikrosatelitních lokusů u čápa simbila .....	23
<b>Tabulka č. 7:</b> Charakteristika 47 polymorfních mikrosatelitních lokusů testovaných na 10 nepříbuzných jedincích čápa simbila .....	32
<b>Tabulka č. 8:</b> Informace o vzorcích čápa simbila ( <i>C. abdimii</i> ) testovaných v pracích Košatová (2020), Kopecký (2022) a tato práce .....	41
<b>Tabulka č. 9:</b> Porovnání výsledků testování 41 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila (tato práce) s publikacemi, v nichž byly tyto lokusy izolovány u zdrojových druhů.....	43
<b>Tabulka č. 10:</b> Porovnání výsledků testování 6 EST a konzervovaných ptačích polymorfních mikrosatelitních lokusů u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila (tato práce) s publikacemi, v nichž byly tyto lokusy popsány .....	45
<b>Tabulka č. 11:</b> Rozdělení všech 836 testovaných <i>cross-species</i> mikrosatelitních lokusů u čápa simbila podle zdrojového řádu.....	46
<b>Tabulka č. 12:</b> Výsledky testování mikrosatelitů u čápa bílého, černého a simbila v rámci 7 zdrojových skupin .....	48
<b>Tabulka č. 13:</b> Srovnání mikrosatelitů z řádů dlouhokřídli, trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů, které byly polymorfní u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila (tato práce) a současně byly polymorfní u dalších 10 druhů z kladu Aequorlitorornithes.....	51

# 1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice s délkou opakujícího se motivu 1 až 6 párů bází a vyskytují se napříč všemi genomy eukaryotických a prokaryotických organismů. Vyznačují se vysokou mutační rychlostí, jsou kodominantní, multialelické a vysoce polymorfní. Tyto vlastnosti dělají mikrosatelity ideálními genetickými markery, které se dají využít pro určování rodičovství, zjištění struktury populací v konzervačních a populačních studiích, ale také je lze využít pro genetické mapování nebo ve forezní vědě. Jejich nevýhodou je dlouhé a nákladné hledání *de novo*. Z tohoto důvodu se využívá metoda *cross-species* PCR amplifikace, při které se využívají páry primerů, které jsou navrženy pro mikrosatelity izolovaného u fylogeneticky blízce příbuzných druhů.

Čáp simbil (*Ciconia abdimii*) je nejmenším zástupcem z řádu čápi (Ciconiiformes) a svým vzhledem připomíná čápa černého (*Ciconia nigra*). Vyskytuje se pouze v Africe a jeho populace čítá stovky tisíc jedinců, ale lidskou činností počet jedinců tohoto druhu klesá a v budoucnu se může stát, že tento druh bude ohrožený. Z tohoto důvodu je dobré mít připravené genetické markery, kterými bude možné zkoumat strukturu populací tohoto druhu, ale také například testovat příbuznost a paternitu jedinců v zoologických zahradách, kde je tento druh také chován. Proto tato diplomová práce bude zaměřena na analýzu a charakterizaci *cross-species* polymorfních mikrosatelitů u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila, kdy tyto mikrosatelity byly již označeny jako polymorfní v mé bakalářské práci (Kopecký, 2022) a v bakalářské práci Košatová (2020).

## **2 Cíle práce**

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
3. Amplifikace a charakteristika mikrosatelitových lokusů na DNA 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfni v bakalářské práci Košatová (2020) a v bakalářské práci Kopecký (2022).

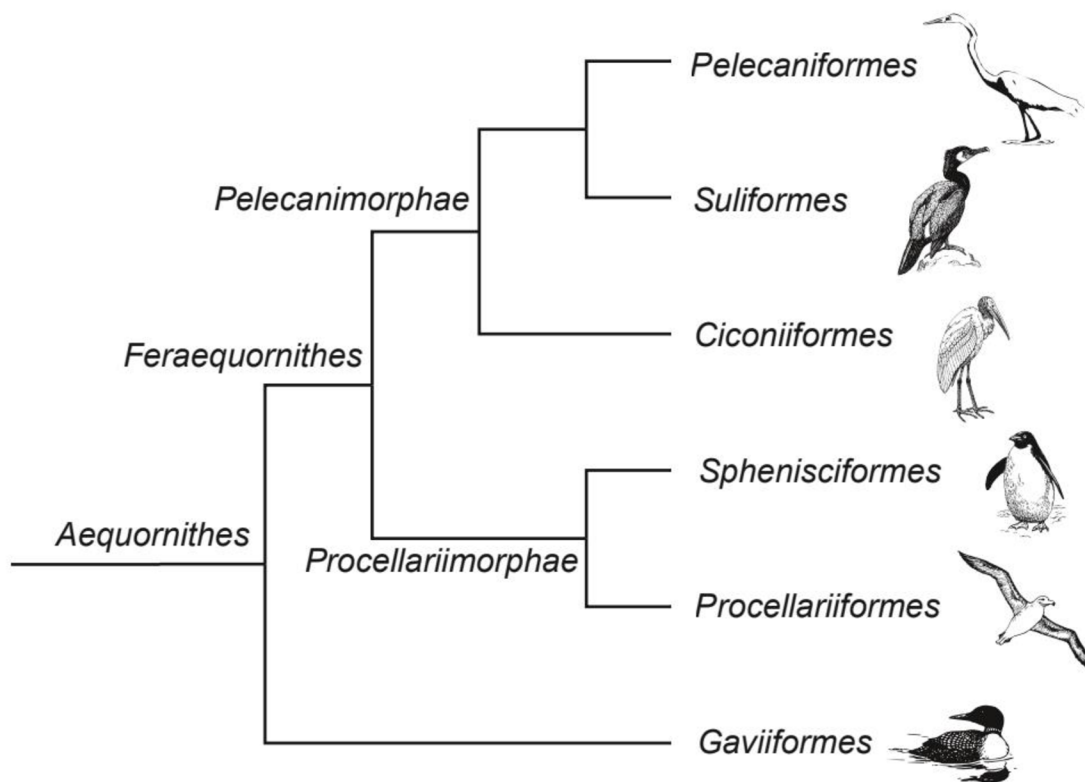
## 3 Literární přehled

### 3.1 Řád čápi

Do řádu Ciconiiformes lze zařadit střední až velmi velké druhy ptáků, které jsou přizpůsobeny získat potravu z vodních a bažinatých biotopů. Charakteristickými znaky pro tyto ptáky jsou dlouhé brodivé nohy s nízko nasazeným palcem, dlouhý klínovitý zobák a schopnost výborně létat a plachtit (Hudec *et al.*, 2016; Gaisler *et Zima*, 2018). Čápi obývají mírný a tropický podnebný pás, kde většina druhů žije v Africe nebo jižní Asii (deHoyo, 2020). Do tohoto řádu lze zahrnout 20 druhů v 6 rodech. První rod se 2 druhy je *Anastomus*, kam lze zařadit zejzoba afrického (*A. lamelligerus*) a asijského (*A. oscitans*). Druhý rod s 8 druhy je *Ciconia*, kam patří čáp bělokrký (*C. episcopus*), bílý (*C. ciconia*), černočelý (*C. microscelis*), černý (*C. nigra*), jihoamerický (*C. maguari*), pestrý (*C. stormi*), simbil (*C. abdimii*) a východní (*C. boyciana*). Třetí rod se 2 druhy je *Ephippiorhynchus*, kam náleží čáp černokrký (*E. asiaticus*) a sedlatý (*E. senegalensis*). Čtvrtý rod je *Jabiru* s pouze 1 druhem čápem jabiru (*J. mycteria*). Pátý rod se 3 druhy je *Leptoptilos*, kam lze zařadit marabua afrického (*L. crumeniferus*), indického (*L. dubius*) a indomalajského (*L. javanicus*). Šestý a zároveň poslední rod se 4 druhy je *Mycteria*, kam patří nesyť africký (*M. ibis*), americký (*M. americana*), bílý (*M. cinerea*) a indomalajský (*M. leucocephala*) (Winkler *et al.*, 2020; Gill *et Donsker*, 2024).

#### 3.1.1 Fylogeneze a systematika kladu Aequornithes

Od konce 90. let minulého století je velkým tématem systematika ptáků a díky analýze fylogenomických dat se povedlo vyřešit mnoho jejich příbuzenských vztahů. V nedávné době byl i objasněn velký klad vodních a semi-vodních ptáků (Ericson *et al.*, 2006; Hackett *et al.*, 2008; Burleigh *et al.*, 2015; Prum *et al.*, 2015; Kimball *et al.*, 2019; Kuhl *et al.*, 2021), který byl pojmenován Aequornithes (Mayr, 2011) (Obrázek č. 1). Do tohoto kladu lze zařadit řády: Ciconiiformes (čápi), Gaviiformes (potáplice), Pelecaniformes (čeledi: člunozobcovití, ibisovití, kladivoušovití, pelikánovití a volavkovití), Procellariiformes (trubkonosí), Sphenisciformes (tučňáci) a Suliformes (čeledi: anhingovití, fregatkovití, kormoránovití a terejovití) (Gill *et Donsker*, 2024). Tyto jednotlivé řády, až na Gaviiformes, jsou uspořádány do dvou menších kladů (Pelecanimorphae a Procellariimorphae), které jsou dále spojeny do jednoho většího kladu, který nově na základě 11 fylogenomických studií pojmenovali Sangster *et Mayr* (2021) jako Feraequornithes.



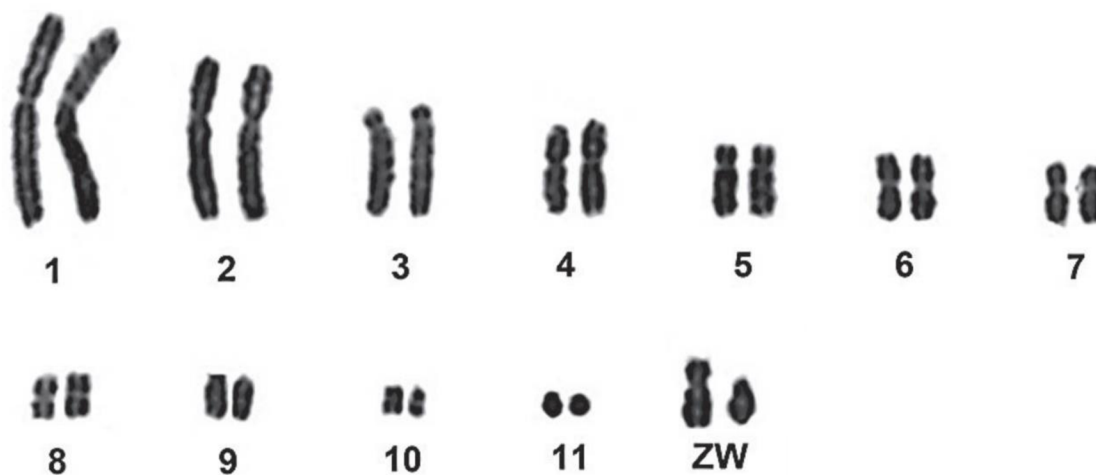
**Obrázek č. 1:** Systém vodních a semi-vodních ptáků. Podle Sangster *et* Mayr (2021), kteří tento systém zakládají na publikacích: Hackett *et al.* (2008), Burleigh *et al.* (2015), Prum *et al.* (2015), Reddy *et al.* (2017), Kimball *et al.* (2019) a Kuhl *et al.* (2021).

### 3.1.2 Cytogenetická analýza u čápů

Od 70. let minulého století se pro výzkum čápů využívají cytogenetické metody, ale přesto o karyotypech čápů existuje jen několik studií, které jsou většinou založeny na konvenčním chromozomovém barvení. Čápi mají diploidní sadu chromozomů, která se skládá z makro- a mikrochromozomů (Belterman *et de* Boer, 1984) a jejich celkový počet se pohybuje od  $2n = 52$  (*C. nigra*) do  $2n = 72$  (*C. maguari* nebo *M. americana*) (de Boer *et* Van Brink, 1982; de Sousa *et al.*, 2023). Karyotyp je popsán u celkem 13 z 20 druhů z řádu čápi (Degrandi *et al.*, 2020) a jejich počty chromozomů včetně referencí na jednotlivé studie jsou uvedeny v Tabulce č. 1. Příklad makrochromozomů z karyotypu čápa jabiru dle Seligmann *et al.* (2019) je na Obrázku č. 2.

**Tabulka č. 1:** Počet chromozomů v diploidní sadě u 13 druhů z řádu čápi.

Druh	Počet chromozomů (2n)	Reference
čáp bělokrký ( <i>C. episcopus</i> )	60	Belterman <i>et de Boer</i> , 1990
čáp bílý ( <i>C. ciconia</i> )	68	Abu Shnaf <i>et Al-Khalifa</i> , 2021
čáp čemokrký ( <i>E. asiaticus</i> )	66	de Boer <i>et Van Brink</i> , 1982
čáp černý ( <i>C. nigra</i> )	52	
čáp jabiru ( <i>J. mycteria</i> )	56	Seligmann <i>et al.</i> , 2019
čáp jihoamerický ( <i>C. maguari</i> )	72	
čáp pestrý ( <i>C. stormi</i> )	68	Takagi <i>et Sasaki</i> , 1974
čáp sedlatý ( <i>E. senegalensis</i> )	66	de Boer <i>et Van Brink</i> , 1982
čáp východní ( <i>C. boyciana</i> )	68	Belterman <i>et de Boer</i> , 1990
marabu africký ( <i>L. crumeniferus</i> )	52	de Boer <i>et Van Brink</i> , 1982
marabu indomalajský ( <i>L. javanicus</i> )	70	Belterman <i>et de Boer</i> , 1990
nesyt americký ( <i>M. americana</i> )	72	de Sousa <i>et al.</i> , 2023
nesyt bílý ( <i>M. cinerea</i> )	70	Belterman <i>et de Boer</i> , 1990



**Obrázek č. 2:** Makrochromozomy z karyotypu samice čápa jabiru (*J. mycteria*) dle Seligmann *et al.* (2019).

U ptáků se kromě konvenčního barvení používá i srovnávací chromozomové barvení, které je důležité pro studium evoluce karyotypu a chromozomální homologie mezi jednotlivými druhy. Při této metodě se používá 11 celochromozomových sond, které jsou odvozené od kura bankivského (*Gallus gallus* - proto označení sond GGA) a odpovídají jeho 10 autozomům a pohlavnímu chromozomu Z (Kretschmer *et al.*, 2018b). Posledních 5 let je tato metoda využívána i u druhů z řádu čápi, u kterých na toto



téma byly publikovány 2 studie u celkem 3 druhů tohoto řádu. První studie od Seligmann *et al.* (2019) byla na čápu jihoamerickém a jabiru. Druhou studii provedli de Sousa *et al.* (2023) na nesytovi americkém. Obě výzkumné skupiny měly velmi podobné výsledky, což naznačuje syntenii (fyzická kolokalizace genetických lokusů na stejném chromozomu v rámci druhů) párů makrochromozomů u řádu čápi. Dále pro tento řád byly objeveny synapomorfie, a to výskyt sond GGA8 a GGA9 na jednom stejném makrochromozomu nebo detekce sondy GGA6 na mikrochromozomu. Seligmann *et al.* (2019) a Sousa *et al.* (2023) také potvrdili teorii o evoluci karyotypu u řádu čápi, která zahrnuje především fúzi mezi mikrochromozomy, se kterou přišli Belterman *et de Boer* (1984, 1990).

### 3.1.3 Ochrana čápů

Počet jedinců v populacích vodních ptáků celosvětově klesá, především v Africe, Asii a Jižní Americe (Wetlands International, 2012). Jednotlivé druhy lze spolehlivě využít jako indikátory změn životního prostředí, kdy jejich populační trendy mohou souviset se stavem mokřadních biotopů a krajiny, kterou obývají (Kushlan, 1993; Amat *et Green*, 2010). Stupně ohroženosti jednotlivých druhů jsou zaznamenávány v červeném seznamu IUCN, který je spravován BirdLife International. V tomto seznamu je zařazeno všech 20 druhů z řádu čápi, kdy 13 z nich má status málo dotčený druh (LC). Další 4 druhy mají status téměř ohrožený druh (NT), kdy se jedná o čápa bělokrkého a černokrkého, marabua indického a indomalajského. Tyto druhy mohou být v blízké budoucnosti ohroženy vyhynutím, ale stále nesplňují kritéria pro zařazení do statusu ohrožený. Poslední 3 druhy mají status ohrožený druh (EN), zde patří nesyt bílý, čáp pestrý a východní. Tyto druhy čelí vysokému riziku vyhynutí v blízké době (IUCN, 2023).

## 3.2 Čáp simbil

Čáp simbil (*C. abdimii*) je nejmenším čápem z řádu Ciconiiformes a obývá pouze území Afriky. Dospělí jedinci mají délku těla 75–80 cm s rozpětím křídel 140 cm a s hmotností až 1,5 kg, kdy samci jsou o něco málo větší než samice (Elliott *et al.*, 2020). Pro tento druh je typické jeho zbarvení - viz Obrázek č. 3, ale může občas morfologicky připomínat čápa černého (*C. nigra*) (Brown *et al.*, 1993). Horní část těla pokrývá černo-fialové peří se zelenými odlesky. Oproti tomu náprsenka, břicho, spodní strana křídel a ocasní pera jsou bílá. Z modré báze vychází světle zelený zobák končící

červenou špičkou. U nedospělých jedinců se vyskytuje spíše hnědší peří s méně odlesky. Mláďata mají světle šedé až bělavé peří (del Hoyo *et al.*, 1992).



**Obrázek č. 3:** Čáp simbil (*Ciconia abdimii*) v Etiopii (Copyright © Ayuwat Jearwattanakanok).

Tento druh se především vyskytuje ve velmi suchých oblastech, včetně polopouští, ale často poblíž vodních ploch. Hnízdí na stromech nebo skalách, ale také poblíž vesnic, kde ho lidé uctívají jako zvěstovatele dešťů. Živí se především hmyzem, ale také drobnými vodními živočichy. Během roku migruje ve velkých hejnech (až desetitisíce jedinců) přes rovník za obdobími dešťů. Od března do listopadu hnízdí severně od rovníku, poté odlétá na zbytek roku do východní a jižní části Afriky (Elliott *et al.*, 2020). Rychlost migrace může být až přes 450 km za den (Jensen *et al.*, 2004). Během hnízdění vydává slabé dvojí pískání, mimo hnízdo je obvykle tichý. Samice snese průměrně za 1 snůšku 1–4 vejce, kdy jejich inkubace trvá 28–29 dní. Po vylíhnutí trvá mláděti 50–60 dnů, než dokáže létat. Nejstarší jedinec se v zajetí dožil více než 21 let (Elliott *et al.*, 2020).

Celosvětová populace čápa simbila je odhadována podle Wetlands International na 300 000 až 600 000 jedinců (Elliott *et al.*, 2020). Podle červeného seznamu IUCN se řadí mezi nejméně dotčené druhy (LC). Bohužel lidskou činností počet tohoto druhu klesá a v budoucnu se může stát, že tento druh bude ohrožený (BirdLife International, 2016).

### 3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity, známé také jako jednoduché sekvenční repetice (SSR), jsou krátké opakující se motivy DNA, které mají obvykle 1–6 párů bází (Katti *et al.*, 2001). Vyznačují se vysokou mutační rychlostí, kdy mutuje přibližně 1 z  $10^2$ – $10^6$  lokusů na generaci (např. náhodná substituce nukleotidu je oproti tomu jen u 1 z  $10^9$  lokusů na generaci), a vysokým polymorfismem (Schlötterer, 2000; Li *et al.*, 2002a). Díky svým vlastnostem se využívají jako genetické markery pro genetické mapování, určování rodičovství, forenzní vědu, populační a konzervační studie a fylogeografii (Hodel *et al.*, 2016). Vyskytují se v genomech prokaryotických a eukaryotických organismů, kde mají většinou nenáhodné rozložení (Toth *et al.*, 2000; Katti *et al.*, 2001). U jednotlivých organismů se můžou funkčně podílet například na alternativním sestřihu, stabilitě mRNA, modulaci vazby transkripčních faktorů a enhancerů, rozestupu mezi promotorovými elementy, výběru míst pro začátek a konec transkripce, vzniku neobvyklých strukturních konformací DNA i RNA, poloze a modifikaci nukleozomů, struktuře chromatinu vyššího řádu a na *hot spotech* při meiotické rekombinaci (Bagshaw, 2017).

#### 3.3.1 Geneze a zánik mikrosatelitů

Předpokládá se, že geneze mikrosatelitů v genomech není náhodná, kdy existuje nerovnováha mezi mechanismy, které podporují a brání jejich vznik. Mikrosatelity lze rozdělit na dva typy podle způsobu vzniku. Prvním typem jsou mikrosatelity vzniklé *de novo*, které se utvářejí spontánně z unikátních sekvencí (Messier *et al.*, 1996). Aby došlo k sklouznutí polymerázy při replikaci a následné expanzi repetice, tak je potřeba minimální počet repetice (Messier *et al.*, 1996; Rose *et al.*, 1998). Z tohoto důvodu existuje předstupeň proto-mikrosatelit. Ten se skládá ze 3–4 opakujících se jednotek v rámci krypticky jednoduchých sekvencí, které jsou definovány jako změň opakujících se motivů postrádajících jasné tandemové uspořádání (Hancock, 1999; Buschiazzo *et al.*, 2006). Tyto proto-mikrosatelity vznikají inserčně-delečními a substitučními mutacemi jednotlivých nukleotidů (Dieringer *et al.*, 2003). Druhým typem jsou adoptované mikrosatelity. Ty jsou z původní polohy přeneseny do recipientní oblasti pomocí mobilních elementů (Wilder *et al.*, 2001). Transponovatelné elementy mohou obsahovat více míst k tvorbě mikrosatelitů a tím je rozptylují po genomu. Příkladem těchto elementů podílejících se na genezi mikrosatelitů jsou Alu elementy z rodiny SINEs (Arcot *et al.*, 1995).

Zánik neboli „smrt“ mikrosatelitů je pomalý a vícefázový proces, kde konečným výsledkem je směs unikátních sekvencí DNA, které obsahují pouze krátké repetice z původního mikrosatelitu. Tento proces zahrnuje opakované bodové mutace, které přerušují repetici a tím zabrání replikačnímu sklouznutí DNA, i opakované delece velkých úseků repetice (Taylor *et al.*, 1999; Buschiazzo *et Gemmell*, 2006).

### 3.3.2 Mutační dynamika mikrosatelitů

Jak již bylo zmíněno, mikrosatelity mutují rychleji než zbytek genomu, a to s různou frekvencí, která je rozdílná mezi jednotlivými lokusy i druhy (Ellegren, 2000). To je do určité míry ovlivněno vnitřními vlastnostmi mikrosatelitů, jako jsou délka opakujícího se motivu, celková délka mikrosatelitu, typ konformace DNA a struktura opakované sekvence (dokonalá, nedokonalá, přerušovaná a složená) (Webster *et al.*, 2002; Ellegren, 2004; Oliveira *et al.*, 2006). Na změně frekvence mutací se také může podílet vysoká míra lokálních substitucí a rekombinací, dokonce i transkripce (Rolfmeier *et Lahue*, 2000; Pearson *et al.*, 2005).

Vysokou četnost mutací u mikrosatelitů vysvětluje několik mutačních mechanismů. Prvním je *DNA slippage*, také označovaný jako „sklouznutí polymerázy“ nebo „chybné spárování sklouznutého vlákna“, který vzniká chybným párováním komplementárních ale nehomologních řetězců DNA při replikaci v místě mikrosatelitu. Nespárovaná část DNA vytváří smyčkovitou strukturu na jednom z řetězců DNA. Počet repetice se zvýší, pokud smyčka vznikla na novém vlákně, nebo se počet repetice sníží, pokud se smyčka vytvořila na templátovém vlákně (Goldstein *et Schlotterer*, 1999; Oliveira *et al.*, 2006). Přestože *in vitro* experimenty prokázaly vysokou míru *DNA slippage* (Streisinger *et Owen*, 1985; Schlotterer *et Tautz*, 1992), tak frekvence vzniku mutací u mikrosatelitů byla snížena až 1000krát. To bylo způsobeno činností opravného aparátu, kterého je součástí i *mismatch repair* proteinový komplex (MMR) (Strand *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2002b). Tento komplex se vyskytuje u mnoha organismů a má na starosti opravu replikačních chyb nebo potlačení rekombinace mezi rozdílnými sekvencemi (Kolodner *et Marsischky*, 1999). U kvasinky pивní (*Saccharomyces cerevisiae*) bylo prokázáno, že nemá funkční opravný MMR systém a zároveň vykazuje 6000krát vyšší míru mikrosatelitních mutací (Sia *et al.*, 1997). Dalším mechanismem je kombinace *DNA slippage* a rekombinace, které byly také pozorovány u kvasinky pивní. Zde byla frekvence vzniku mutací o 800krát vyšší oproti samotnému *DNA slippage* (Richard *et Pâques*, 2000). Posledním mechanismem je tzv. *indel slippage*, také označovaný jako sklouznutí

polymerázy nezávislé na délce (*length independent slippage*) (Dieringer *et al.*, 2003). Tento proces je podobný inzerčně-delečním mutacím, které duplikují krátké sekvence (Zhu *et al.*, 2002). Na rozdíl od klasického *DNA slippage* je tento mechanismus nezávislý na celkové délce mikrosatelitu a vykazuje stálou frekvenci vzniku mutací i u mikrosatelitů s malým počtem repetic (Coenye *et al.*, 2005).

Proto, aby byly správně odhadnuty populační parametry, jako je efektivní velikost populace, počet migrantů a struktura populace, je potřeba mutační model vývoje mikrosatelitů (Estoup *et al.*, 1998). Celkem je popsáno 5 základních mutačních modelů pro mikrosatelity, a to model nekonečného počtu alel (IAM), model K-alel (KAM), model postupných mutací (SMM), dvoufázový model (TPM) a model proporcionální skluzové/bodové mutace (PS/PM), kdy každý z těchto modelů má své výhody a nevýhody (Bhargava *et al.*, 2010).

### **3.3.3 Distribuce mikrosatelitů u ptáků**

Přestože ptáci vykazují obrovskou fenotypovou rozmanitost, tak jejich genomy obsahují malé procento repetitivních sekvencí DNA (4–10 %), včetně mikrosatelitů (1,5 %) (Zhang *et al.*, 2014; Srivastava *et al.*, 2019). V porovnání s ostatními obratlovci mají ptáci nejnižší průměrnou hustotu mikrosatelitů s velmi malou variabilitou (Srivastava *et al.*, 2019). Předpokládá se, že tyto vlastnosti genomu by mohly souviset se selekčním tlakem adaptace na let, který vyžaduje vysokou míru oxidativního metabolismu (Hughes *et al.*, 1995; Hughes *et al.*, 2005). Také akumulace repetitivních sekvencí, včetně mikrosatelitů, je spojena se zvětšením pohlavních chromozomů W a Z (de Oliveira, 2017; de Souza *et al.*, 2020). To mohlo dříve vést k diferenciaci pohlavních chromozomů (Matsubara *et al.*, 2016) a evoluci karyotypů (Kretschmer *et al.*, 2018a; Kretschmer *et al.*, 2021).

Feng *et al.* (2023) zjišťovali distribuci mikrosatelitů u celkem 53 druhů ptáků z 16 řádů. V této studii jsou mikrosatelity rozděleny na 3 typy - dokonalé (P-SSR), nedokonalé (I-SSR) a složené (C-SSR). U ptáků se nejvíce vyskytují I-SSR (70–85 %), poté P-SSR (15–28 %) a nejméně C-SSR (0,4–2,2 %). U většiny ptačích druhů převažují jednonukleotidové repetice s nejvíce vyskytujícím se motivem  $A_{(n)}$ . Celkový poměr dvounukleotidových repetic vůči zbylým velikostem repetic (do 6 bp.) je nejnižší oproti ostatním obratlovcům (2–3 %) (Srivastava *et al.*, 2019). Frekvence velikostí repetitivních motivů se velmi liší mezi jednotlivými druhy ptáků, proto ji nelze vysvětlit pomocí fylogenetických vztahů (Feng *et al.*, 2023). Ptáci oproti jiným obratlovcům mají své

genomy obohacené o 2 specifické pentanukleotidové repetice, a to o AAACC a AAAGG, a o 2 jedinečné hexanukleotidové repetice, jedná se o AAAACC a AAAAGG. Celé ptačí genomy mají obsah GC 42 %, oproti tomu průměrný obsah GC všech ptačích mikrosatelitů je menší, a to 32 %. (Srivastava *et al.*, 2019). U P-SSR je vyšší obsah GC u delších motivů než u kratších. Zároveň P-SSR v kódujících oblastech genomu mají nejvyšší obsah GC oproti mikrosatelitům ležícím mimo tyto oblasti. To naznačuje, že P-SSR jsou v kódujících oblastech konzervativnější. Dále bylo zjištěno, že oba konce genů, bez ohledu, zda se nacházejí v exonech nebo intronech, jsou hojně zastoupeny P-SSR. To může souviset s biofyzikálními vlastnostmi proteinů. Tyto geny podle anotací souvisejí s přenosem signálu a buněčnými procesy (Feng *et al.*, 2023).

### **3.4 Mikrosatelitní lokusy popsané u druhů z řádu čápi**

Řád čápi zahrnuje celkem 20 druhů, kde u 4 z nich bylo popsáno celkem 46 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Jedná se o nesyta amerického (*M. americana*) s popsány 15 polymorfními lokusy, čápa bílého (*C. ciconia*) s 18 polymorfními lokusy, čápa východního (*C. boyciana*) s 8 polymorfními lokusy a marabua afrického (*L. crumeniferus*) s 5 polymorfními lokusy.

U čápa simbila nebyly dosud popsány *de novo* polymorfní mikrosatelitní lokusy. Z tohoto důvodu vznikají práce, které hledají polymorfní mikrosatelity metodou *cross-species*. U této metody se využívají páry primerů, které byly popsány pro polymorfní mikrosatelitní lokusy izolované u příbuzných druhů ptáků. Touto problematikou se u tohoto druhu zabývaly práce vedené v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, jednalo se o práce Nevimová (2012), Novosadová (2012), Fišerová (2014), Košatová (2020), Kopecký (2022) a tato práce. Více informací o této problematice je uvedeno v kapitole č. 6 Diskuse.

#### **3.4.1 Mikrosatelitní lokusy popsané u nesyta amerického**

Na přelomu tisíciletí se zabývali Van Den Bussche *et al.* (1999) genetickou strukturou devíti kolonií nesyta amerického v rámci území Floridy a Georgie v USA. Pro tento účel popsali 10 mikrosatelitních markerů, ale pouze 4 z nich byly polymorfní (WS01, WS02, WS04 a WS06), a jen ty využili na následnou analýzu populací. Pro výzkum byla odebrána krev 136 mládřatům nesyta amerického, z toho pocházelo 54 mládřat ze 3 stanovišť na Floridě a 82 mládřat z 6 stanovišť v Georgii. Z této krve byla

podle protokolu Longmire *et al.* (1997) vyextrahována DNA a ta byla následně otestována na zmíněné 4 polymorfni markery pomocí PCR amplifikace. Pouze u lokusu WS1 se vyskytovaly 3 alely, u zbylých lokusů byly jen 2 alely. Na základě genetické analýzy těchto 4 mikrosatelitních lokusů byla zjištěna nízká alelická diverzita a divergence mezi jednotlivými koloniemi. Také se mezi nimi významně nelišila frekvence alel. Výsledky se shodovaly s předchozími studii a autoři označili všech 9 kolonií za jednu velkou populaci, kde se mezi jednotlivými koloniemi vyskytuje vysoká úroveň genetického toku.

Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) charakterizovali u nesyta amerického 11 polymorfni mikrosatelitních markerů (WS03, WS08, WS09, WS13, WS14, WS17, WS18, WS19, WS20, WS23 a WS24), aby určili u tohoto druhu jeho genetickou variabilitu v rámci jeho populací v rámci Severní a Jižní Ameriky, i mezi těmito kontinenty. Pro výzkum byla použita genomická DNA, která byla extrahována podle protokolu Davis *et al.* (2000) z krve 31 jedinců tohoto druhu (20 jedinců pocházelo z Národního parku Everglades, USA; 11 jedinců bylo z brazilského spolkového státu Mato Grosso). S pomocí získaných dat o sekvenci DNA jednoho z těchto jedinců bylo navrženo 24 párů primerů pro mikrosatelitní lokusy, které byly následně amplifikovány u všech 31 jedinců. Z 24 lokusů bylo 11 polymorfni se 2 až 4 alelami. Tyto polymorfni markery dále použili ve své studii Sharma *et al.* (2014), kde je testovali *cross-species* na DNA nesyta indomalajského a všechny tyto lokusy vytvořily PCR produkt. Autoři ve studii neuvádějí, zda se u lokusů vyskytoval polymorfismus. Hlavním cílem této studie byla výtěžnost DNA z vypelichaného peří různé velikosti v porovnání s vytrhnutými pery z mrtvého jedince. Závěrem této studie bylo, že velká vytrhnutá pera z mrtvých ptáků obsahují koncentrovanější a kvalitnější DNA než z opelichaných per, kde DNA byla degradovaná, ale i tak 80 % PCR amplifikací vytvořilo detekovatelný produkt. Tímto autoři zjistili, že lze pro výzkum mikrosatelitních lokusů u nesyta indomalajského využít degradovanou DNA pocházející z jeho vypelichaných per.

### **3.4.2 Mikrosatelitní lokusy popsané u čápa bílého**

Jako první Shephard *et al.* (2009) popsali u čápa bílého 7 polymorfni mikrosatelitních markerů (Cc01, Cc02, Cc03, Cc04, Cc05, Cc06 a Cc07), které byly použity např. v ZOO Planckendael (Belgie) k analýze paternity nebo k charakterizaci struktury populací tohoto druhu na úrovni jeho celého areálu. Z tkáně čápa bílého byla vyzolována genomická DNA, kde následně byly identifikovány mikrosatelitní lokusy

pomocí obohacovacího protokolu podle Zane *et al.* (2002). Poté na tyto lokusy bylo navrženo celkem 57 párů primerů a ty byly otestovány na DNA 30 jedinců čápa bílého. Pouze 7 z těchto lokusů bylo polymorfních se 2–10 alelami.

Turjeman *et al.* (2016) v návaznosti na předešlou publikaci izolovali 11 polymorfních mikrosatelitních markerů (Cc10, Cc15, Cc18, Cc37, Cc42, Cc44, Cc50, Cc58, Cc61, Cc69 a Cc72) u čápa bílého. Autoři nejdříve našli mikrosatelitní lokusy s využitím sekvenčních dat DNA dvou čápů bílých (severní Izrael a severní Německo). Tímto postupem bylo získáno 64 mikrosatelitních lokusů, které měly požadovanou délku 100–350 bp. Ze získaných sekvencí byly pro tyto lokusy navrženy páry primerů, které byly dále otestovány na DNA 94 jedinců čápa bílého. Po této analýze bylo vybráno 11 polymorfních lokusů na základě vyššího počtu alel a úspěšnosti amplifikovat daný lokus. Těchto 11 polymorfních mikrosatelitních markerů bylo dále otestováno na DNA 213 jedinců čápa bílého, kdy 152 jedinců pocházelo ze severovýchodního Německa a 61 jedinců z východního Řecka. Při této analýze autoři detekovali 2 až 10 alel na lokus s průměrem 5,3. Průměrná a očekávaná heterozygotnost byla 0,519 a 0,565. Také se žádný z lokusů u obou populací neodchýlil od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a pravděpodobnost totožnosti (PID) byla dostatečně nízká. Všechny tyto dobré vlastnosti 11 markerů naznačují jejich užitečnost např. pro řešení ekologických otázek nebo určení paternity u tohoto druhu.

### **3.4.3 Mikrosatelitní lokusy popsané u čápa východního**

Počátečním výzkumem mikrosatelitů u čápa východního se zabývali Wang *et al.* (2011), kde publikovali u tohoto druhu 8 polymorfních mikrosatelitních markerů (Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168 a Cbo235). Nejdříve byla vyzolována genomická DNA 23 jedinců čápa východního z krve a tkáně podle protokolu Sambrook *et al.* (1989) proteináza-K/fenol-chloroformovou extrakcí. DNA jednoho z těchto jedinců byla použita pro nalezení 14 mikrosatelitních lokusů podle protokolu FIASCO (*Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats*). Pouze 8 z těchto lokusů vykazovalo stabilní amplifikaci, a proto dále byly jen tyto lokusy testovány na DNA 23 jedinců tohoto druhu, kdy všechny lokusy byly polymorfní s 2 až 8 alelami. Všechny lokusy až na Cbo133 a Cbo235 byly v Hardy-Weinbergově rovnováze.

Prvním příkladem využití výše popsaných mikrosatelitních markerů je projekt obnovy čápa východního v Jižní Koreji. Tomuto projektu se věnovali Hyun-Ju *et al.* (2023), kde zkoumali u tohoto druhu demografii a genetickou diverzitu v letech 1996 až



2018. Celkově bylo otestováno 172 čápů, kdy 141 jedinců pocházelo z populace ze zajetí a 31 jedinců z populace z rané reintrodukce. Na genetickou analýzu bylo použito 8 polymorfních mikrosatelitních markerů, z nichž 5 pocházelo od čápa východního - Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo151 a Cbo168 (Wang *et al.*, 2011), další 2 pocházely od nesyta amerického - WS14 a WS17 (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003) a jeden od čápa bílého - Cc01 (Shephard *et al.*, 2009). Tato studie odhalila každoroční změny v genetické diverzitě populace čápů východních v zajetí během již zmíněných 22 let. Po genotypizaci obou populací na těchto 8 polymorfních markerů autoři našli u lokusu Cc01 odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Také všechny lokusy byly u obou populací polymorfní a počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 8. Lokusy Cbo108 a Cbo121 měly v populaci v zajetí o jednu alelu více oproti druhé populaci. Závěrem této studie bylo, že se genetická diverzita populace v zajetí při dlouhodobém rozmnožování ustálila. Tento výsledek může přispívat k obavám o genetickou diverzitu populací v zajetí. Autoři proto doporučují pravidelně vyhodnocovat genetickou diverzitu u populací v zajetí a reintrodukovat jedince na základě jejich zjištěného genotypu pomocí genetických markerů.

V druhém případě jsou dříve popsané polymorfní mikrosatelitní markery u čápa východního použity jako *cross-species* markery. Kaminsin *et al.* (2023) se ve své studii zabírali identifikací introgresních hybridů mezi nesytem bílým (*M. cinerea*) a indomalajským (*M. leucocephala*) v Thajsku. Tyto dva druhy nesyťů vykazují podobnosti ve vzhledu a chování, ale také jsou si evolučně blízké s malou genetickou divergencí. Nesyta indomalajského lze morfologicky odlišit od nesyta bílého podle kresby a zbarvení opeření, včetně černobílých znaků na křídlech, ale také podle černého pruhu přes prsa a sytě narůžovělých terciárních per (Slikas, 1997 a 1998; Urfi, 2011). Obecně hybridizací mezi dvěma původními druhy postupně zaniká genofond čistého druhu. Zároveň se ukazuje, že vznik hybridů má negativní vliv na původně geneticky čisté druhy (Leonard *et al.*, 2014; Todesco *et al.*, 2016; Wayne *et al.*, 2016; Adavoudi *et al.*, 2021). Tento jev může mít za následek zánik čistého genetického druhu nesyta bílého, který patří mezi ohrožené druhy podle červeného seznamu IUCN (BirdLife International, 2023).

Kaminsin *et al.* (2023) v této studii použili 3 různé analýzy. První byla morfologická, kde bylo vizuálně zkoumáno celkem 212 dospělých jedinců od obou druhů nesyťů a byly u nich zjištěny 3 fenotypové skupiny. Nejvýraznějším znakem u hybridů

byla nezřetelnost nebo úplná absence černého pruhu přes prsa. Druhá byla fylogenetická analýza mtDNA, kde bylo otestováno 100 jedinců nesyta indomalajského, 37 hybridních jedinců a 53 jedinců nesyta bílého. Zde autoři odhalili asymetrickou introgresi mtDNA z nesyta bílého do nesyta indomalajského, kde v linii nesyta bílého obsahovaly sekvence mtDNA pouze jeden haplotyp, zatímco v linii nesyta indomalajského se nacházely tři různé haplotypy mtDNA lišící se o 1–2 bp. Třetí byla analýza populační struktury s využitím 14 polymorfních mikrosatelitních markerů, kdy 6 pocházelo od čápa východního (Cbo108, Cbo109, Cbo133, Cbo151, Cbo168 a Cbo235) - viz Wang *et al.* (2011) a 8 od čápa bílého (Cc05, Cc06, Cc07, Cc10, Cc42, Cc50, Cc58 a Cc72) - viz Shephard *et al.* (2009) a Turjeman *et al.* (2016). Tyto markery byly otestovány celkem na 114 jedincích (24 nesytů indomalajských, 37 hybridních jedinců a 53 nesytů bílých) na základě morfologické analýzy. Bylo detekováno 10 polymorfních lokusů s 2 až 12 alelami. Lokusy Cbo133, Cbo235 a Cc05 byly monomorfní a u lokusu Cc06 se autorům nepodařil určit počet alel. Tato velká studie poskytla zásadní informace pro identifikaci introgresních hybridů u těchto dvou druhů nesyta, které budou užitečné pro zachování obou geneticky čistých druhů a pro jejich následnou reintrodukci.

#### **3.5.4 Mikrosatelitní lokusy popsáné u marabua afrického**

Ferrie *et al.* (2013) se zabývali populací marabua afrického v Disney's Animal Kingdom® parku na Floridě. U této populace ověřovali rodičovství v porovnání se záznamy v plemenné knize, ale i zkoumali reprodukční chování u tohoto druhu. Pro účel tohoto výzkumu izolovali 5 polymorfních mikrosatelitních markerů (Lcru101, Lcru105, Lcru107, Lcru108 a Lcru109) pro tento druh čápa. Byly odebrány vzorky 30 jedincům marabua afrického, ze kterých byla následně získána genomická DNA pomocí standardní fenol-chloroformové extrakce dle protokolu Sambrook *et Russell* (2001). Poté na DNA jednoho jedince bylo pomocí obohacovacího protokolu (podobný protokol byl použit u čápa bílého - Zane *et al.*, 2002) identifikováno 10 mikrosatelitních lokusů. Na tyto lokusy byly navrhnuty páry primerů, které byly následně otestovány na DNA 30 jedinců marabua afrického. Pět z deseti lokusů bylo polymorfních a autoři u nich popsali 5 až 11 alel na lokus. Autoři dále uvedli, že jednotlivé polymorfní lokusy jsou v Hardy-Weinbergově rovnováze a že mezi nimi neexistuje žádná vazba. Z výsledků analýzy autoři sestavili rodokmen testovaných jedinců žijících v Disney's Animal Kingdom® parku a zjistili, že některé záznamy v plemenné knize byly chybné.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál pro *cross-species* analýzu vybraných mikrosatelitních lokusů byl získán zaměstnanci Safari Parku Dvůr Králové z 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Podrobnější informace o těchto jedincích a jejich provázanosti mezi pracemi Košatová (2020) a Kopecký (2022) jsou uvedeny v kapitole č. 6 Diskuse. Z odebraných vzorků krve byla vedoucím mé diplomové práce vyizolována genomická DNA pomocí fenol-chloroformové izolační metody. Tato DNA byla následně rozpuštěna v TE pufru a poté u ní byla změřena koncentrace pomocí spektrofotometru NanoDrop. DNA byla naředěna na finální koncentraci 10 až 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### 4.2 Seznam použitých chemikálií

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

- N, N' - methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Tekuté stěrače Rain Off (Sheron)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (AppliChem)
- Triton X-100 (Amresco)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

### **4.3 Seznam použitých roztoků a jejich příprava**

#### **Fix/stop roztok**

- 88 ml ledové kyseliny octové
- 800 ml deionizované vody

#### **Nanášecí pufr**

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

#### **Reakční pufr pro PCR (10×)**

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

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

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

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

- 40 g hydroxidu sodného rozpustit v 1 l deionizované vody

**Roztok kyseliny dusičné (1%)**

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

**Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu**

- 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
- 3 µl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

**Roztok peroxodisíranu amonného (10%)**

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

**Roztok polyakrylamidového gelu (6%)**

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

**Vývojka**

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

**Zásobní roztok (6%) akrylamidu : N, N'- methylenbisakrylamidu (19 : 1)**

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

**Zásobní roztok TBE pufru (10×)**

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

#### 4.4 Seznam použitých laboratorních přístrojů

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipeta Finnpiquette 0,5–10  $\mu$ l - osmikanálová (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Finnpiquette 0,3  $\mu$ l–1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu$ l–1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA 1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler XP Thermal Cyclor (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Ice Flanker (Brema Ice Makers)

#### 4.5 PCR amplifikace DNA čápa simbila

PCR amplifikace byla provedena s genomickou DNA 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila. PCR reakční směs byla připravena pro 10 vzorků a následně do každé PCR směsi byl přidán jeden pár primerů pro amplifikaci jednoho z analyzovaných mikrosatelitních lokusů. Postup přípravy vzorků pro amplifikaci byl následující:

1. Rozmrazit všechny složky PCR směsi a poté všechny (kromě polymerázy) zvortexovat a zcentrifugovat.

- Do 1,5ml mikrozkušavky napipetovat jednotlivé složky podle Tabulky č. 2. Následně PCR směs jemně promíchat pomalým překlápěním a zcentrifugovat.

**Tabulka č. 2:** Složení PCR reakční směsi pro 10 vzorků.

Složka PCR reakční směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Objem složek pro 10 vzorků [ $\mu$ l]
Deionizovaná voda	-	73,0
Reakční pufr pro PCR	10 $\times$	11,2
Roztok MgCl <sub>2</sub>	25 mmol·l <sup>-1</sup>	6,7
Roztok dNTPs	20 mmol·l <sup>-1</sup>	1,2
Primer R	10 $\mu$ mol·l <sup>-1</sup>	5,5
Primer F	10 $\mu$ mol·l <sup>-1</sup>	5,5
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	5 U· $\mu$ l <sup>-1</sup>	3,0

- Do 10 předem popsaných 0,2ml PCR zkušavek napipetovat osmikanálouovou pipetou po 1  $\mu$ l genomické DNA všech 10 jedinců. Následně do každé z těchto zkušavek s genomickou DNA připipetovat 9  $\mu$ l připravené PCR směsi.
- PCR mikrozkušavky s napipetovanými vzorky důkladně uzavřít, vložit do termocykleru a nastavit teplotní program podle Tabulky č. 3.

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

Krok PCR	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	30 s	
<i>Annealing</i>	T <sub>A</sub> *	30 s	35
Elongace	72	30 s	
Finální elongace	72	7 min	1

Legenda: \* - Teplota *annealingu* (T<sub>A</sub>) začínala u nově testovaných lokusů na 50  $^{\circ}$ C a u již popsaných polymorfních lokusů byla nastavena na finální teploty uvedené v pracích Košatová (2020) a Kopecký (2022). Dále tato teplota byla optimalizována zvlášť u každého lokusu v závislosti na vzniklém PCR produktu.

#### 4.6 Amplifikované mikrosatelitní lokusy u čápa simbila

Pro analýzu a charakterizaci vybraných polymorfních mikrosatelitních lokusů byly použity páry primerů pro lokusy, které byly označeny jako polymorfní v bakalářských pracích Košatová (2020) a Kopecký (2022) pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace na DNA 6 nepříbuzných jedincích čápa simbila. V práci Košatová (2020) se jednalo o 21 párů primerů odvozených od EST, od konzervovaných ptačích mikrosatelitů a od druhů z řádu tučňáci (*Sphenisciformes*) - viz Tabulka č. 4. Z mé bakalářské práce (Kopecký, 2022) bylo použito 26 párů primerů pocházejících od druhů z řádů dlouhokřídlí (*Charadriiformes*) a trubkonosí (*Procellariiformes*) - viz Tabulka č. 5.

**Tabulka č. 4:** Přehled polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila popsanych v bakalářské práci Košatová (2020).

Zdroj	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
EST ptačí mikrosatelity	TG01-077	Dawson <i>et al.</i> , 2010
	TG01-148	
	TG04-061	
	TG11-011	
Konzervované ptačí mikrosatelity	CAM-05	Dawson <i>et al.</i> , 2013
	CAM-11	
	CAM-24	
Tučňák Humboldtův ( <i>Spheniscus humboldti</i> )	Sh2Ca12	Schlosser <i>et al.</i> , 2003
	Sh2Ca58	Schlosser <i>et al.</i> , 2009
Tučňák nejmenší ( <i>Eudyptula minor</i> )	Em5	Grosser <i>et Waters</i> , 2015
	Em23	
	Emm2	Billing <i>et al.</i> , 2007
	Emm8	
Tučňák uzdičkový ( <i>Pygoscelis antarcticus</i> )	Pygantarc29	Kang <i>et al.</i> , 2015
Tučňák žlutooký ( <i>Megadyptes antipodes</i> )	Man27	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008
	Man47	
Tučňák žlutorohý ( <i>Eudyptes chrysolophus</i> )	Ech007	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
	Ech011	
	Ech020	
	Ech030	
	Ech036	



**Tabulka č. 5:** Přehled polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila popsaných v bakalářské práci Kopecký (2022).

Řád	Zdroj	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
Dlouhokřídli (Charadriiformes)	Kulík mořský ( <i>Charadrius alexandrinus</i> )	Calex-01	Brown <i>et al.</i> , 2009
	Racek novozélandský ( <i>Chroicocephalus novaehollandiae</i> )	RGB18M	Welch <i>et al.</i> , 2011
	Albatros bělohřbetý ( <i>Phoebastria albatrus</i> )	STAL18	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
	Albatros černonohý ( <i>P. nigripes</i> )	BFAL4	
Trubkonosí (Procellariiformes)	Albatros stěhovavý ( <i>Diomedea exulans</i> )	11H7 De3	Dubois <i>et al.</i> , 2005 Burg, 1999
	Buňáček dlouhokřídlý ( <i>Hydrobates leucorhous</i> )	Ole10 Ole19 Ole21	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
	Buňáček Monteirův ( <i>H. monteiroi</i> )	Omn2 Omn8 Omn25	Bried <i>et al.</i> , 2012
	Buňák baleárský ( <i>Puffinus mauretanicus</i> )	Puff G2C	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
	Buňák bělobradý ( <i>Procellaria aequinoctialis</i> )	Paequ8	Techow <i>et al.</i> , 2004
	Buňák Bulwerův ( <i>Bulweria bulwerii</i> )	Bb21	Andris <i>et al.</i> , 2010
	Buňák havajský ( <i>Pterodroma sandwichensis</i> )	Ptero02 Ptero09	Welch <i>et al.</i> , 2011
	Buňák světlonohý ( <i>Puffinus carneipes</i> )	Pc A115 Pc B109 Pc D103	Hardesty <i>et al.</i> , 2013
	Buňák útlozobý ( <i>Pachyptila belcheri</i> )	Pacbel_07265 Pacbel_16989 Pacbel_17944 Pacbel_19907	Moodley <i>et al.</i> , 2015
		Patbel1 Patbel2	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012

V této práci bylo také nově testováno 68 párů primerů pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace DNA 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila - viz Tabulka č. 6. Celkem 34 párů primerů pocházelo od druhů z řádů Pelecaniformes, 11 párů od čápa bílého (*C. ciconia*), 3 páry od druhů z řádu plameňáci (Phoenicopteriformes), 11 párů od potápky západní (*A. occidentalis*) a 9 párů od druhů z řádu Suliformes. Z tohoto testování byly následně vybrány polymorfní lokusy, které byly dále charakterizovány.

**Tabulka č. 6:** Přehled nově testovaných mikrosatelitních lokusů u čápa simbila.

Řád	Zdroj	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
Pelecaniformes	Volavka rusohlavá ( <i>Bubulcus ibis</i> )	Bi01, Bi08, Bi13, Bi15, Bi18, Bi20, Bi22, Bi26, Bi28, Bi29, Bi30	Campanini <i>et al.</i> , 2012
	Volavka žlutozobá ( <i>Egretta eulophotes</i> )	Ee04, Ee06, Ee10, Ee17, Ee18, Ee20, Ee22, Ee23, Ee24, Ee26, Ee28, Ee30, Ee33, Ee34, Ee37, Ee41, Ee42, Ee43, Ee44, Ee45, Ee46, Ee50, Ee51	Dai <i>et al.</i> , 2013
Čápi (Ciconiiformes)	Čáp bílý ( <i>Ciconia ciconia</i> )	Cc10, Cc15, Cc18, Cc37, Cc42, Cc44, Cc50, Cc58, Cc61, Cc69, Cc72	Turjeman <i>et al.</i> , 2016
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopiterus ruber</i> )	Pr $\mu$ 5	Preston, 2005
	Plameňák růžový ( <i>P. roseus</i> )	PrB1, PrB2	Geraci <i>et al.</i> , 2010
Potápky (Podicipediformes)	Potápka západní ( <i>Aechmophorus occidentalis</i> )	B8, B11, B102, B112b, B113, C5, E202, G118, G206, G209, G215	Humple, 2009
Suliformes	Kormorán tasmánský ( <i>Phalacrocorax fuscescens</i> )	Pf7, Pf11, Pf13, Pf33, Pf35, Pf36, Pf39	Riordan <i>et al.</i> , 2012
	Kormorán ušatý ( <i>Nannopterum austritum</i> )	Dcco-04	Mercer <i>et Mullins</i> , 2010
	Terej guánový ( <i>Sula veriegata</i> )	Sv2A-95	Taylor <i>et al.</i> , 2010

## 4.7 Elektroforetická separace PCR produktů

PCR produkty byly elektroforeticky separovány za denaturujících podmínek v předem připraveném 6% polyakrylamidovém gelu ve vyhřívané sekvenční elektroforetické komůrce S2 (Whatman Biometra). Tento gel byl nalit mezi velké sklo s rozměry 330 × 420 mm a malé sklo s rozměry 330 × 390 mm. Tloušťka gelu byla 0,4 mm. Separované PCR produkty byly následně vizualizovány dusičnanem stříbrným. Celý postup byl proveden následovně:

### Ošetření skel

1. Plochu velkého skla, která bude v kontaktu s gelem, vyčistit pomocí papírových ubrousků 2× deionizovanou vodou a 2× ethanolem.
2. Na vyčištěnou plochu velkého skla nanést přípravek odpuzující vodu (RainOff) a dobře ho rozetřít po celé ploše skla pomocí úzkého proužku (cca 1 cm) papírového ubrousku. Po zaschnutí přípravku (cca 3 min) tuto ošetřenou plochu 2× omýt deionizovanou vodou a osušit papírovými ubrousky.
3. Plochu malého skla, která bude v kontaktu s gelem, vyčistit za pomoci papírových ubrousků 2× deionizovanou vodou a 2× ethanolem. Malé sklo přemístit do digestoře na polystyrenovou destičku a na omytou plochu nanést roztok obsahující 3 µl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu rozpuštěného v 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu. Tento roztok dobře rozetřít po celé ploše skla pomocí úzkého proužku papírového ubrousku. Po zaschnutí (cca po 1 min) omýt tuto plochu 4× ethanolem a osušit papírovými ubrousky.
4. V digestoři na druhou polystyrenovou destičku položit velké sklo ošetřenou plochou nahoru a k jeho okrajům umístit dva spacers. Malé sklo v ruce otočit, položit ošetřenou plochou dolů na velké sklo, zarovnat spacers podél hran skel a pořádně přirazit malé sklo ke gumičkám spaceru. V místě spacerů z každé strany sepnout 2 malými svorkami.

### Příprava 6% roztoku polyakrylamidového gelu

1. V digestoři do válce odměřit 60 ml pracovního roztoku akrylamidu : N, N'-metylenbisakrylamidu 19 : 1 a následně ho přelít do kádinky. Následně k tomuto roztoku mikropipetou přidat 400 µl 10% roztoku peroxidisíranu amonného

a 40  $\mu$ l N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu. Krouživými pohyby směs opatrně promíchat.

2. Vyplnit prostor mezi skly přichystaným 6% roztokem polyakrylamidového gelu. Lití gelu si lze usnadnit pomocí náklonu skla špičkami nebo poklepáváním na sklo.
3. Hřebínek zasunout rovnou stranou do prostoru mezi skly do hloubky cca 5 mm od okraje malého skla a obě skla v místě hřebínku sepnout 4 velkými svorkami.
4. Zbytek roztoku v kádince přelit do určené nádoby a připravený gel nechat tuhnout po dobu jedné hodiny.

### **Elektroforetická separace**

1. Po ztuhnutí gelu všechny svorky odstranit, skla namočit a kartáčem v místě hřebínku jemně odstranit zbytky gelu. Vnější stranu malého skla opláchnout vodou a tu poté setřít pryč pomocí stěrky na sklo.
2. Skla s gelem umístit do sekvenační komůrky hřebínkem nahoru tak, aby vnější plocha malého skla těsně doléhala na hliníkovou desku komůrky. Připevnit skla pomocí šroubů ke komůrce. Do horního (katodového) a dolního (anodového) prostoru komůrky nalít 0,5 $\times$  TBE pufr.
3. Vyjmout hřebínek a vzniklý prostor mezi skly vyčistit plastovou stěrkou (pozor na poškození gelu). Následně tento prostor vypláchnout pomocí injekční stříkačky, aby zde nebyly žádné zbytky gelu.
4. Horní a dolní prostor komůrky uzavřít a připojit ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu. Na zdroji nastavit napětí 3 000 V, proud 150 mA, výkon 90 W a nechat gel 30 minut nahřívat.
5. Během nahřívání gelu ke každému z PCR produktů připipetovat 5  $\mu$ l nanášejícího pufru. Přibližně 2 minuty před koncem nahřívání vložit vzorky do termocyklieru a nechat je 3 minuty denaturovat. Mezitím si připravit nádobu s ledem a po uplynutí času denaturace ihned umístit vzorky do ledu.
6. Po uplynulém času nahřívání gelu zastavit zdroj elektrického proudu, odpojit elektrody a opět pomocí plastové stěrky a injekční stříkačky vyčistit prostor mezi

skly od zbytků gelu, močoviny a vzduchových bublin. Hřebínek ihned zasunout do gelu cca 1 mm hluboko.

7. Do prostoru mezi zoubky hřebínku nanést osmikanálovou pipetou po 2  $\mu$ l každého vzorku. Mezi opakováními promývat špičky a poté je otřít o papírový ubrousek.
8. Horní prostor komůrky opět uzavřít, připojit elektroforetickou aparaturu ke zdroji elektrického proudu. U něho změnit hodnotu výkonu na 70 W a nechat vzorky separovat po dobu 90 minut.
9. Po dobu separace vzorků připravit roztoky pro vizualizaci gelu (viz podkapitola 4.3 Seznam použitých roztoků a jejich příprava): vývojka, fix/stop roztok, roztok kyseliny dusičné (1%), roztok dusičnanu stříbrného (0,1%).
10. Po dokončení elektroforetické separace vypnout a odpojit zdroj stejnosměrného elektrického proudu. Mírně uvolnit šroub na odtok pufru z horního prostoru a poté uvolnit šrouby upevňující skla s gelem k aparatuře.
11. Skla s gelem přenést z komůrky na vodorovnou plastovou podložku, vyjmout oba spacery a pomocí čepele nože od sebe skla opatrně oddělit.

### **Vizualizace gelu**

1. Malé sklo s přichyceným gelem nahoře umístit do první fotomisky. Poté misku položit na třepačku, zalít fix/stop roztokem a nechat působit 20 minut. Po uplynutí tohoto času fix/stop roztok slít zpět do baňky a sklo s gelem 4 $\times$  promýt deonizovanou vodou.
2. Fotomisku s gelem opět položit na třepačku, zalít 1% roztokem kyseliny dusičné a nechat působit 4 minuty. Po uplynutí této doby roztok vylít do odpadu a sklo s gelem 4 $\times$  promýt deonizovanou vodou.
3. Při promývání přidat 1 200  $\mu$ l formaldehydu k 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného. Sklo s gelem vložit do druhé fotomisky, umístit ji na třepačku a zalít gel tímto roztokem.
4. Těsně před uplynutím 30 minut naplnit třetí fotomisku deonizovanou vodou a přidat k vychlazené vývojce 1 200  $\mu$ l formaldehydu a 160  $\mu$ l 1% roztoku thiosíranu sodného.

5. Po 30 minutách působení roztoku dusičnanu stříbrného slít tento roztok zpět do zásobní lahve a sklo s gelem ponořit na 5 sekund do třetí fotomisky naplněné vodou. Poté přemístit sklo do čtvrté fotomisky umístěné na třepačce a nalít k němu vývojkou.
6. V gelu dostatečně zbarvené PCR produkty zalít fix/stop roztokem a zastavit tím proces barvení. Po vyšumění bublin vylít roztok do odpadu a gel přemístit do třetí fotomisky s připravenou deonizovanou vodou.
7. Sklo s gelem v místě spaceru osušit papírovým ubrouskem, popsat, nechat okapat a umístit do sušárny. Po hodině sušení gel vyndat, nechat vychladnout, vyhodnotit na negatoskopu a naskenovat do počítače.
8. Sklo s vyhodnoceným gelem ponořit do  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  roztoku hydroxidu sodného, poté očistit kartáčem a omýt deonizovanou vodou se saponátem.

#### **4.8 Statistické vyhodnocení experimentu**

Genotypy polymorfních mikrosatelitních lokusů u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila byly analyzovány pomocí dvou populačně-genetických programů. Jednalo se o Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008). Programem Cervus byly stanoveny hodnoty pozorované ( $H_{\text{obs}}$ ) a očekávané ( $H_{\text{exp}}$ ) heterozygotnosti, zda jsou lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze, polymorfní informační obsah (PIC) a frekvence výskytu nulových alel ( $F_{\text{null}}$ ). Programem Genepop bylo určeno, zda mezi dvojicemi analyzovaných polymorfních lokusů existuje vazba.

## 5 Výsledky

Cílem experimentální části mé diplomové práce byla analýza a charakteristika 47 vybraných *cross-species* mikrosatelitních lokusů na DNA 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila. Tyto lokusy označili jako polymorfni Košatová (2020) a Kopecký (2022) pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace na DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila. Ve své bakalářské práci Košatová (2020) našla celkem 21 polymorfni mikrosatelitních lokusů, kdy 14 z nich pocházelo od druhů z řádu tučňáci. Další 4 lokusy byly EST ptačí mikrosatelity a 3 konzervované ptačí mikrosatelity. V mé bakalářské práci (Kopecký, 2022) bylo nalezeno celkem 26 polymorfni mikrosatelitních lokusů, z nich 24 bylo popsáno u druhů z řádu trubkonosí a 2 u druhů z řádu dlouhokřídli. Provázanost mezi jednotlivými jedinci v obou pracích a touto diplomovou prací je uvedeno v kapitole č. 6 Diskuse.

Tyto analyzované lokusy byly na počátku testovány při PCR amplifikaci na teploty *annealingu* ( $T_A$ ), které jsou uvedeny v obou pracích. U většiny lokusů byly potřeba podmínky PCR amplifikace dále optimalizovat a finální  $T_A$  byla upravena tak, aby byla možná genotypizace PCR produktů po jejich elektroforetické separaci. Finální  $T_A$  byla v rozmezí od 44 do 69 °C. Dále při optimalizaci PCR amplifikace jsem u celkem 5 lokusů snížil koncentraci hořčičných iontů v PCR směsi z původní koncentrace 1,58 mmol·l<sup>-1</sup> na koncentraci třičtvrtěční (1,18 mmol·l<sup>-1</sup>). Jednalo se o lokusy CAM-05, De3, Em23, Omn8 a Pacbel\_16989. Pro lepší rozlišení alel a následnou genotypizaci polymorfni lokusů byla také upravena doba elektroforetické separace PCR produktů, která se pohybovala od 90 do 240 minut.

Při genotypizaci 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila na celkem 47 mikrosatelitních lokusech jsem získal u 41 lokusů polymorfni produkt. Na rozdíl od obou bakalářských prací jsem ve své diplomové práci u lokusů BFAL4, Ech020, Emm2, Man47, Patbel1 a Pc A115 nenalezl žádný mikrosatelitní polymorfismus, proto jsem tyto lokusy vyřadil z další analýzy. V této diplomové práci se mi nepodařil určit počet alel u 3 polymorfni lokusů. Jednalo se o lokusy Em23, Ole19 a TG04-061. Bylo to z důvodu špatné rozlišitelnosti jednotlivých alel po elektroforetické separaci. Tyto 3 lokusy byly vyřazeny z dalších analýz.

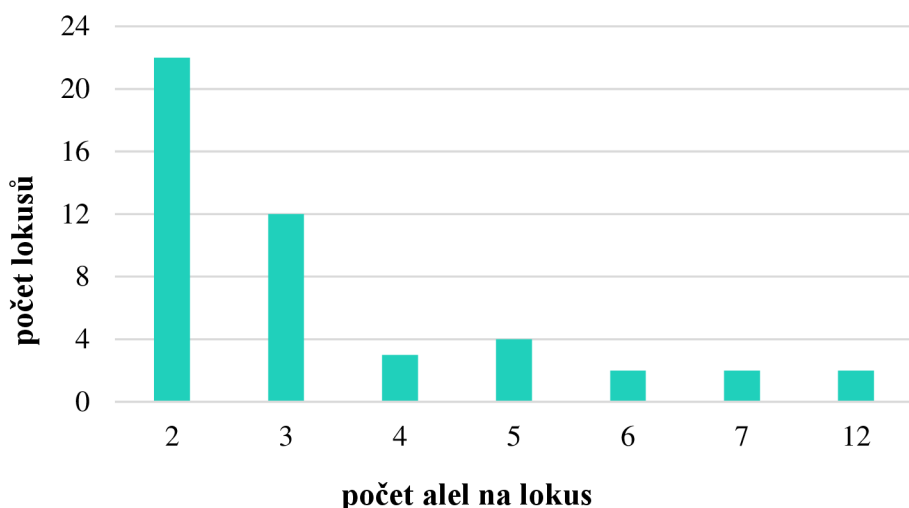
Navíc v mé diplomové práci bylo nově otestováno metodou *cross-species* PCR amplifikace 68 párů primerů pro mikrosatelitní lokusy s cílem nalezení dalších polymorfních markerů pro tento druh. Celkem 34 párů primerů pocházelo od druhů z řádu Pelecaniformes, 11 párů od čápa bílého (*C. ciconia*), 3 páry od druhů z řádu plameňáci (Phoenicopteriformes), 11 párů od potápky západní (*A. occidentalis*) a 9 párů od druhů z řádu Suliformes. Testování a následná charakterizace nalezených polymorfních mikrosatelitních lokusů byla také provedena na DNA 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila.

U těchto nově testovaných lokusů byla stanovena počáteční  $T_A$  na 50 °C. Tato teplota byla také dále optimalizována pro lepší genotypizaci PCR produktů po jejich elektroforetické separaci. Finální  $T_A$  se pohybovala v rozmezí 51 až 67 °C. Také jako u předchozích analyzovaných lokusů pro lepší rozlišení alel a snazší genotypizaci byla upravena doba elektroforetické separace PCR produktů na 90 až 250 minut.

Ze všech 68 nově testovaných mikrosatelitních lokusů poskytlo polymorfní produkt 9 párů testovaných primerů (13,2 %). Jednalo se o lokusy: B102 a G215 od potápky západní (Humple, 2009), Cc10, Cc42 a Cc72 od čápa bílého (Turjeman *et al.*, 2016); Ee18, Ee20 a Ee43 od volavky žlutozobé (Dai *et al.*, 2013) a Pf36 od kormorána tasvánského (Riordan *et al.*, 2012). Zbylé lokusy byly monomorfní.

V této diplomové práci jsem na DNA 10 nepříbuzných čápů simbila celkem charakterizoval 47 polymorfních mikrosatelitních lokusů - viz Tabulka č. 7. Z těchto lokusů pocházely 3 od čápa bílého (řád čápi), 1 od kulíka mořského a 1 racka novozélandského (řád dlouhokřídli), 3 od volavky žlutozobé (řád Pelecaniformes), 2 od potápky západní (řád potápky), 1 od kormorána tasvánského (řád Suliformes), 20 od deseti druhů z řádu trubkonosí a 10 od pěti druhů z řádu tučňáci. Posledních 6 lokusů byly EST a konzervované ptačí mikrosatelity. V rámci počtu alel jsem u těchto 47 lokusů detekoval 2–12 alel s průměrem na lokus 3,4. U 22 lokusů (47 %) jsem popsal dvě alely, u 12 lokusů (26 %) tři alely, u 3 lokusů (6 %) čtyři alely, u 4 lokusů (9 %) pět alel a po dvou lokusech (po 4 %) šest, sedm a dvanáct alel. Rozdělení 47 polymorfních lokusů podle počtu alel u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila je znázorněno na Obrázku č. 4. Mezi nejpolymorfnější mikrosatelity s 12 alelami patřily lokusy CAM-05 (konzervovaný ptačí mikrosatelity) a Patbel2 (buňňák útlozobý).





**Obrázek č. 4:** Rozdělení 47 polymorfních mikrosatelitních lokusů analyzovaných u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila podle počtu alel.

Pomocí programu Cervus 3.0.7 jsem analyzoval genotypy 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila pro 47 polymorfních mikrosatelitů. U těchto lokusů byly stanoveny pomocí tohoto programu populačně-genetické parametry, a to pozorovaná ( $H_{obs}$ ) a očekávaná ( $H_{exp}$ ) heterozygotnost, odchylka od Hardy-Weinbergovy (HW) rovnováhy, polymorfní informační obsah (PIC) a frekvence výskytu nulových alel ( $F_{null}$ ). Průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,4915. V HW rovnováze bylo 17 lokusů a u zbylých 30 lokusů nedokázal program Cervus 3.0.7 vyhodnotit, zda se u nich vyskytuje odchylka od HW rovnováhy z důvodu analýzy malého počtu jedinců. U žádného z testovaných polymorfních lokusů nebyla nalezena odchylka od HW rovnováhy. Průměrný PIC byl 0,4165. U 21 z 47 polymorfních lokusů se objevovala pravděpodobnost výskytu nulových alel. Tato pravděpodobnost byla u 3 lokusů do 5 %, u 3 lokusů mezi 5 až 10 %, u 8 lokusů mezi 10 až 20 %, u 2 lokusů mezi 20 až 30 % a u 3 lokusů mezi 30 až 40 %. Nejvyšší pravděpodobnost na výskyt nulových alel byla u lokusů Puff G2C (43,48 %) a Cc10 (57,85 %).

Dále programem Cervus 3.0.7 byly vypočítány pravděpodobnosti chybné paternitní analýzy s využitím těchto 47 polymorfních mikrosatelitů. V případě, kdyby byl přiřazován první rodič k mláděti, u něhož by nebyl známý ani jeden z rodičů, by byla pravděpodobnost chybného přiřazení  $1,8465 \cdot 10^{-4}$ . V případě, kdyby byl známý pouze jeden rodič, tak by byla pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče  $8 \cdot 10^{-8}$  a pravděpodobnost chybného přiřazení celého rodičovského páru k mláděti by byla  $8,458 \cdot 10^{-13}$ . Dále byla vypočítána pravděpodobnost, kdy dva náhodní nepříbuzní jedinci

by nesli identickou alelovou sestavu pro všech 47 analyzovaných polymorfních lokusů. Tato pravděpodobnost byla  $1,654 \cdot 10^{-25}$ . Pravděpodobnost, že by dvě náhodně vybraná mláďata měla identickou alelovou sestavu pro již zmíněných 47 polymorfních lokusů, byla  $1,17 \cdot 10^{-11}$ .

Programem Genepop 4.7.5 bylo analyzováno, zda mezi 47 polymorfními mikrosatelity neexistuje vzájemná vazba. Všechny lokusy byly testovány po dvojicích a nebyla mezi nimi nalezena žádná vazba neboli se jedná o 47 navzájem nezávislých genetických markerů.

**Tabulka č. 7:** Charakteristika 47 polymorfních mikrosatelitních lokusů testovaných na 10 nepříbuzných jedincích čápa simbila. V tabulce je uveden název lokusu s daným *Accession number* uvedeným v databázi GenBank, zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, teplota *annealingu* ( $T_A$ ), čas elektroforetické separace ( $t_s$ ), počet alel ( $N_A$ ), pozorovaná ( $H_{obs}$ ) a očekávaná ( $H_{exp}$ ) heterozygotnost, odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW) (NS - lokus je v souladu s HW rovnováhou, ND - lokus nelze vyhodnotit), polymorfni informační obsah (PIC) a frekvence výskytu nulových alel ( $F_{null}$ ).

Lokus (GB <i>Acc. No.</i> )	Zdroj	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	$T_A$ [°C]	$t_s$ [min]	$N_A$	$H_{obs}$ HW	$H_{exp}$	PIC	$F_{(null)}$ [%]
<b>11H7</b> (AY945753)	Albatros stěhovavý	F: GCAAGCTAAGTTGGGGGTAA R: ACAGTAGGGCTGCTGCAGAT	AC	56	150	2	0,200 ND	0,189	0,164	–
<b>B102</b> (neuvedeno)	Potápka západní	F: ACCCATCCATCCATACCTG R: GCCCAAACCATCTGTGAT	CATC	58	210	2	0,200 ND	0,189	0,164	–
<b>Bb21</b> (HM171897)	Buňák Bulwerův	F: CTGATGTTCCAGGCCCTAAT R: CCTCTGAGCCAGCTAATTCC	TG	66	180	2	0,100 ND	0,100	0,090	–
<b>Calex-01</b> (AM072445)	Kulík mořský	F: CTTCTCCATTGTTGTACCTCCAGT R: CTTGACTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT /GTGC	69	150	2	0,300 ND	0,395	0,305	11,11
<b>CAM-05*</b> (HG518763)	Konzervované ptačí mikrosatelity	F: TTACACAGACTGCAAACCGC R: CTGTTKCTCTAGTAATGAGATCCTG	CA	51	180	12	1,000 ND	0,953	0,897	–
<b>CAM-11</b> (HG518769)		F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGRGAGCGGATG	GT	67	90	4	0,500 NS	0,658	0,578	13,00
<b>CAM-24</b> (HG518782)		F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	CA	62	90	2	0,200 ND	0,442	0,442	35,48
<b>Cc10</b> (KT232056)	Čáp bílý	F: TGTGACAGATGCAAAGCTCC R: GTGTTTACTAGTTGGCTGTTCC	AGAT	61	90	2	0,100 ND	0,395	0,395	57,85

Tabulka č. 7: Pokračování 1.

Lokus (GB Acc. No.)	Zdroj	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	T <sub>A</sub> [°C]	t <sub>S</sub> [min]	N <sub>A</sub>	H <sub>obs</sub> HW	H <sub>exp</sub>	PIC	F <sub>(null)</sub> [%]
<b>Cc42</b> (KT232060)	Čáp bílý	F: GCAGGAAAGGAGGAAAGGTG R: GCATCACAGTATGCAAACGC	AGAT	67	225	6	0,800 ND	0,832	0,759	–
<b>Cc72</b> (KT232066)		F: CATTGAAGATACTGGGCAGCC R: GATCCCTTCATCACCAGCAG	AT	67	150	3	0,300 NS	0,637	0,527	36,68
<b>De3*</b> (AF096789)	Albatros stěhovavý	F: CTGCCAAAAAGAATTCCTG R: CCAACAAGGACTAAGCCCAA	AC	62	90	4	0,600 NS	0,711	0,619	7,73
<b>Ech007</b> (FM878338)	Tučňák žlutorohý	F: CAGTGAAGCATTCTCTCGCAGAAC R: AAGCTTGGTGCCCGTATCTTTG	CTTT	69	180	2	0,200 ND	0,189	0,164	–
<b>Ech011</b> (FM878342)		F: CACAGCACTGTGACAGAAGCA R: TTAAGTGGTTCGATTTGTCAGTCTTT	GT	66	90	3	0,600 NS	0,568	0,466	–
<b>Ech030</b> (FM878361)		F: TGACGCCGCAGGGACTTC R: GCTCAGCTCTTGCTCACAGTTTCAG	CTAT	69	180	2	0,200 ND	0,189	0,164	–
<b>Ech036</b> (FM878367)		F: GAGAGGGTTCAGAATGACATCACG R: GTCCATGGGAGCAGACCTGAG	GT	69	150	5	0,600 ND	0,511	0,460	–
<b>Ee18</b> (KJ748381)	Volavka	F: GCAGTTGGACTAGATGAACATTGT R: CTTCCATGATAAACCAATACCCAGC	ATTCT /TTCCA	59	90	5	0,600 ND	0,816	0,739	12,48
<b>Ee20</b> (KJ748382)	žlutozobá	F: CAGGTCCCTTCCAACAGAAATAT R: TGCTTCAAATAGGTCTCTTCTACAT	CTATG	58	250	5	0,600 NS	0,774	0,694	10,22

Tabulka č. 7: Pokračování 2.

Lokus (GB Acc. No.)	Zdroj	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	T <sub>A</sub> [°C]	t <sub>S</sub> [min]	N <sub>A</sub>	H <sub>obs</sub> HW	H <sub>exp</sub>	PIC	F <sub>(null)</sub> [%]
<b>Ee43</b> (KJ748394)	Volavka žlutozobá	F: TGGGATTCTTTATAGAAAGCACGGTG R: GCAGTTGGGCTAGATGATCATTGTAG	ATAGA	56	150	5	0,500 NS	0,568	0,508	0,25
<b>Em5</b> (KM272224)	Tučňák	F: CGGAGACCTTGCATCTTACC R: CAGTCCTGTACCTCCCTCAC	AAAT	59	90	3	0,500 ND	0,484	0,410	–
<b>Emm8</b> (DQ852599)	nejmenší	F: TGCACACTAGCAGATACGG R: GACAAATTGTGCTTGTCAGC	CA/CT	61	150	2	0,500 NS	0,479	0,351	–
<b>G215</b> (neuvedeno)	Potápka západní	F: GACAGGACAACCCTTTTATCC R: TGGTGGTCTCTGACAGGTC	TAGA	55	90	2	0,400 ND	0,337	0,269	–
<b>Man27</b> (EU267114)	Tučňák žlutooký	F: GATCCTGAGAAGAGAGACAG R: GGCTGTTCATTTTGTCAC	GA/CA /TG/GCA	60	90	3	0,500 NS	0,616	0,495	8,30
<b>Ole10</b> (FR696386)	Buřňáček	F: ACCAGCTCCTAACTGGAAGCCAC R: TGCAGGTAGGTTCTCAGTATGCAAAG	CA	61	180	3	0,300 ND	0,358	0,314	13,35
<b>Ole21</b> (FR696397)	dlohokřídlý	F: CCACGAGAAATGGACATACAAC R: TGAAGAACTTCCGAAATAACTGTG	GA/A /GAAA	64	120	2	0,200 ND	0,442	0,332	35,48
<b>Omn2</b> (JQ303227)	Buřňáček	F: GATTTTCGTCTTGCTTCCAAA R: AACAAATAACCAGGATTGATAATA	AC/AT	60	180	2	0,500 ND	0,395	0,305	–
<b>Omn8*</b> (JQ303232)	Monteirův	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTAAA	AC	59	90	7	0,800 NS	0,774	0,707	–

Tabulka č. 7: Pokračování 3.

Lokus (GB Acc. No.)	Zdroj	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	T <sub>A</sub> [°C]	t <sub>S</sub> [min]	N <sub>A</sub>	H <sub>obs</sub> HW	H <sub>exp</sub>	PIC	F <sub>(null)</sub> [%]
<b>Omn25</b> (JQ303242)	Buňáček Monteirův	F: TCTGCTCCCCCTGATTATTG R: ACTCTGAGAGCCATCCATCA	ATGG	61	180	3	0,600 NS	0,637	0,527	1,72
<b>Pacbel_07265</b> (neuvedeno)		F: CGTCACTTTAATAGCGCTGGC R: ACCCTGATTTTCCCAGTCCG	GT	59	90	2	0,400 ND	0,337	0,269	–
<b>Pacbel_16989*</b> (neuvedeno)	Buňák útlozobý	F: TGCTTTTGGACAATGTGGAGG R: TCTGGTACTTCTCATTTGGAC	CA	63	90	2	0,400 NS	0,505	0,365	9,05
<b>Pacbel_17944</b> (neuvedeno)		F: TACAACCGTTCTCCCTGTGG R: GGAGAAGCAGGCAGCAATAC	TG	68	90	2	0,200 ND	0,189	0,164	–
<b>Pacbel_19907</b> (neuvedeno)		F: TTTCTCCTTAGCTCGGCAGG R: CCATACTTGGTGGCAGTGTG	AG	59	90	2	0,600 NS	0,526	0,375	–
<b>Paequ8</b> (AY371074)	Buňák bělobradý	F: TATTCTGAGACTTGCGTTATCC R: GTGATCCATTAGTTGATGTCTACTG	CA	44	180	2	0,500 ND	0,395	0,305	–
<b>Patbel2</b> (JF288776)	Buňák útlozobý	F: GGTGTCATGCAACTGACTGAA R: CAATGGGAATGGCAGAGACT	CTAT	66	240	12	1,000 ND	0,921	0,864	–
<b>Pc B109</b> (JX435475)	Buňák	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATTGAGGATGTAGGTTCC	CAA	66	120	2	0,200 ND	0,337	0,269	23,08
<b>Pc D103</b> (JX435479)	světlenohý	F: GGAAAGATGTCATGCTGATGA R: GTGGGAGATTCATAGGCAAAG	GATA /GATG	53	90	3	0,500 ND	0,416	0,347	–

Tabulka č. 7: Pokračování 4.

Lokus (GB Acc. No.)	Zdroj	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	T <sub>A</sub> [°C]	t <sub>S</sub> [min]	N <sub>A</sub>	H <sub>obs</sub> HW	H <sub>exp</sub>	PIC	F <sub>(null)</sub> [%]
<b>Pf36</b> (JX5-47003)	Kormorán tasmánský	F: CGACGTTGTA AAAACCGGAAAGTAT R: CATTAAGTTCCCATTATGAGGTCAGCC	AATAG	51	90	6	0,500 NS	0,684	0,620	14,87
<b>Ptero02</b> (HQ918219)	Buřňák havajský	F: AAGCGCTTCACTGGAGG R: TGACCTGTGTGCCTTCATTC	CA	65	150	4	0,900 NS	0,721	0,627	–
<b>Ptero09</b> (HQ918226)		F: GCAAATACCAGTCTTCCAAAGG R: TTAAAGATAAAGATGTTTGAGAACCA	AAGG	60	150	7	0,700 NS	0,679	0,612	–
<b>Puff G2C</b> (EU158898)	Buřňák baleárský	F: CTGAAATCAGACATTATTTTC R: ACAATATGCAAACCTTTTTG	GT	55	90	2	0,100 ND	0,268	0,222	43,48
<b>Pygantarc29</b> (KP316226)	Tučňák uzdičkový	F: TGTCCAAAATCCTGGAAAGTG R: CAAAAGAGCCCTGAGCA	AG	64	150	2	0,500 ND	0,395	0,305	–
<b>RBG18M</b> (HQ918229)	Racek novozélandský	F: TTGTTCTTGGCTTCTATCTC R: CGCTGAAGATGTAGAGGGAAA	GT	65	90	2	0,100 ND	0,100	0,090	–
<b>Sh2Ca12</b> (AF540010)	Tučňák Humboldtův	F: TCAGTGTACGAGCCAGAAGG R: CTAGGATCCCGGCTTTTGTC	T/CA/A	62	90	2	0,400 ND	0,337	0,269	–
<b>Sh2Ca58</b> (AY435091)	Tučňák Humboldtův	F: TACAGCAATGCAGCGTGTGT R: ACCTGGTAGAGGGCAGTAGT	GT	66	90	3	0,300 ND	0,426	0,368	13,35
<b>STAL18</b> (neuveдено)	Albatros bělohřbetý	F: CAGTTCCAAAGAAGGAAAACC R: GTTTGGAGTGGTCTTGGGTACAGC	ATG	63	150	3	0,400 NS	0,667	0,527	18,75

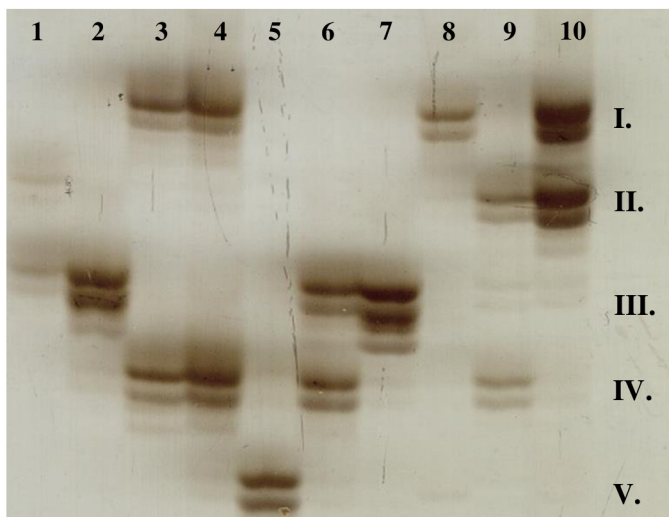
Tabulka č. 7: Pokračování 5.

Lokus (GB Acc. No.)	Zdroj	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	T <sub>A</sub> [°C]	t <sub>S</sub> [min]	N <sub>A</sub>	H <sub>obs</sub> HW	H <sub>exp</sub>	PIC	F <sub>(null)</sub> [%]
<b>TG01-077</b> (CK305147)		F: GGTATGTCAGTTATCAAAAACAAGC R: AAATGGCAGGTAAGGATACTCTC	A/C	66	90	3	0,600 NS	0,695	0,586	4,96
<b>TG01-148</b> (CK301512)	EST ptačí mikrosatelity	F: TTGCAACACATTCTAATATTGC R: TTTAAAGTACATCAAACAACAAAATC	AT/AC	61	180	3	0,500 ND	0,426	0,368	–
<b>TG11-011</b> (CK308096)		F: ACAAACTAAGTACATCTATATCTGAA R: TAAATACAGGCAACATTGG	AT	60	150	3	0,300 ND	0,468	0,381	23,39

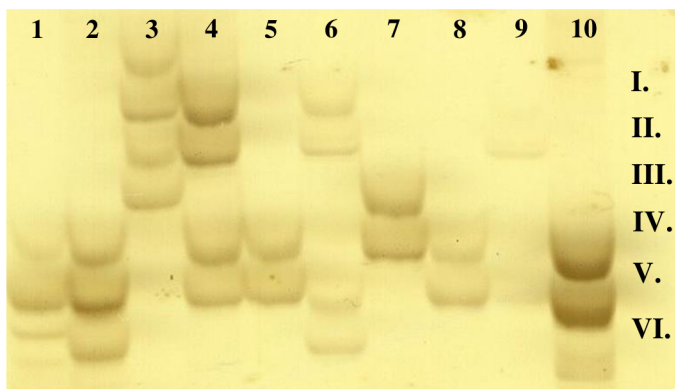
Legenda: \* - tříčtvrteční koncentrace hořčnatých iontů v PCR směsi (1,18 mmol·l<sup>-1</sup>) oproti původní koncentraci (1,58 mmol·l<sup>-1</sup>)



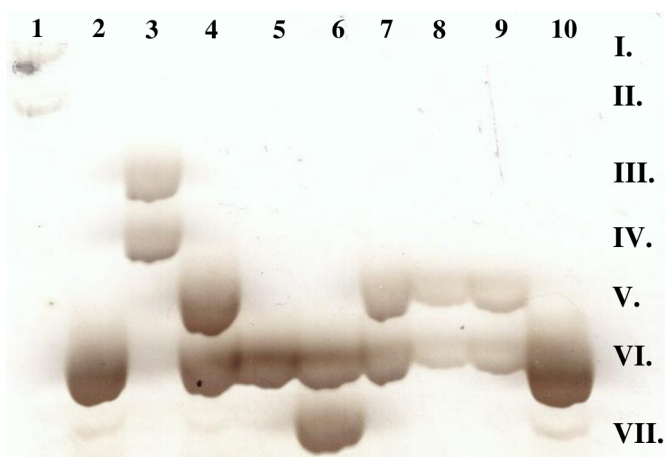
Při použití mikrosatelitních markerů neovlivňují jejich praktičnost pouze statistické charakteristiky, ale také jestli jsou jednotlivé elektroforeticky separované mikrosatelitní lokusy dobře hodnotitelné v gelu. Během analýzy některé lokusy vytvářely k hlavnímu produktu více vedlejších produktů pro každou alelu (žebříčkovitý profil v gelu). Tento problém může do jisté míry ovlivnit chybovost při určování genotypů. Příkladem těchto mikrosatelitů jsou lokusy: CAM-05, Omn8 a Sh2Ca58. Zbylé lokusy při PCR amplifikaci vytvářely k hlavnímu produktu maximálně 1–2 vedlejší produkty pro každou alelu, ale díky dostatečné rozlišitelnosti alel tyto vedlejší produkty neovlivnily genotypování jedinců pro daný lokus. Příkladem těchto mikrosatelitů jsou lokusy: Ee18 (Obrázek č. 5), Pf36 (Obrázek č. 6) a Ptero09 (Obrázek č. 7). Tuto poslední skupinu mikrosatelitních lokusů doporučuji využít jako vhodné a reprodukovatelné genetické markery.



**Obrázek č. 5:** Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Ee18 testovaného u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila. PCR amplifikace tohoto lokusu probíhala při  $T_A$  59 °C a délka elektroforetické separace byla 90 minut. Římskými číslicemi jsou vyznačeny jednotlivé alely (I.–V.) a arabské číslice označují jednotlivé jedince (1–10).



**Obrázek č. 6:** Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Pf36 testovaného u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila. PCR amplifikace tohoto lokusu probíhala při  $T_A$  51 °C a délka elektroforetické separace byla 90 minut. Římskými číslicemi jsou vyznačeny jednotlivé alely (I.–VI.) a arabské číslice označují jednotlivé jedince (1–10).



**Obrázek č. 7:** Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitního lokusu Ptero09 testovaného u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila. PCR amplifikace tohoto lokusu probíhala při  $T_A$  60 °C a délka elektroforetické separace byla 150 minut. Římskými číslicemi jsou vyznačeny jednotlivé alely (I.–VII.) a arabské číslice označují jednotlivé jedince (1–10).

## 6 Diskuse

Výsledkem experimentální části mé diplomové práce byla charakterizace 47 *cross-species* polymorfních mikrosatelitních lokusů u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila, kdy u těchto lokusů byly určeny populačně-genetické parametry pomocí programů Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008).

### **Srovnání výsledků této diplomové práce s pracemi Košatová (2020), Kopecký (2022) a Fišerová (2014)**

V rámci 47 charakterizovaných polymorfních mikrosatelitů v této práci bylo 16 z nich dříve testováno na 6 nepříbuzných jedincích čápa simbila v bakalářské práci Košatová (2020), kde autorka označila tyto mikrosatelity jako polymorfní. Autorkou testovaní nepříbuzní jedinci čápa simbila byli shodní s mými jedinci 1 až 6 (Tabulka č. 8). Při srovnání  $T_A$  pro testované lokusy oproti autorce jsem ve své práci u 6 lokusů tuto teplotu zvýšil o 1–3 °C. U lokusů Pygantarc29, Sh2Ca12 a TG01-148 byla  $T_A$  zvýšena dokonce o 9 °C. U dalších 2 lokusů byla  $T_A$  snížena o 2–3 °C a u zbylých 5 lokusů  $T_A$  zůstala na finální hodnotě, kterou autorka určila ve své práci. Dále v rámci testování mikrosatelitů autorka popsala u lokusů Emm2 a Man47 dvě alely a u lokusu Ech020 tři alely, ale po mém několikanásobném testování při různých  $T_A$  byly tyto lokusy určeny jako monomorfní. V rámci své práce autorka označila za nejpolymorfnější lokus CAM-05, u kterého popsala 9 alel na 6 jedincích. Tento lokus patří mezi dva nejpolymorfnější lokusy popsané v mé diplomové práci. Já jsem u toto lokusu našel 12 alel na 10 jedincích.

Dalších 22 polymorfních lokusů charakterizovaných v této práci jsem již dříve testoval na 6 nepříbuzných jedincích čápa simbila v mé bakalářské práci (Kopecký, 2022), kde jsem tyto mikrosatelity označil jako polymorfní. Testování nepříbuzní jedinci čápa simbila v mé bakalářské práci byli shodní s jedinci použitými v mé diplomové práci. V bakalářské práci se jednalo o jedince, kteří jsou označeni v diplomové práci jako 2, 4, 5, 6, 7 a 10 (Tabulka č. 8). Při srovnání  $T_A$  pro testované lokusy v mé bakalářské práci jsem ve své diplomové práci u 9 lokusů  $T_A$  snížil o 1–7 °C. U dalších 7 lokusů jsem  $T_A$  zvýšil o 1–7 °C a u zbylých 6 lokusů  $T_A$  zůstala stejná jako finální  $T_A$ , kterou jsem uvedl pro tyto lokusy ve své bakalářské práci. Dále v rámci testování lokusů jsem ve své bakalářské práci určil u lokusů BFAL4, Patbel1 a Pc A115 dvě alely, ale v diplomové práci jsem u těchto lokusů nakonec nenalezl žádný mikrosatelitní polymorfismus. V mé diplomové práci jsem při retestování lokusu BFAL4 při různých  $T_A$  detekoval jeho hlavní

monomorfní produkt a poté variabilní vedlejší produkty, které se lišily mezi jednotlivými testy. Kvůli těmto vedlejším produktům jsem ve své bakalářské práci označil chybně tento lokus za polymorfní. Lokus Patbel1 při opakovaném retestování na 10 jedincích byl monomorfní. Oproti tomu lokus Pc A115 vykazoval u šestého jedince variabilitu, ale po opakovaném testování jsem určil, že se velmi pravděpodobně nejedná o mikrosatelitní polymorfismus. Z tohoto důvodu byl lokus Pc A115 vyřazen z další analýzy. Ve své bakalářské práci jsem při genotypizaci 6 jedinců našel nejvíce alel u lokusu Omn8, a to 6. Ve své diplomové práci jsem u tohoto lokusu popsal 7 alel. Za nejpolymorfnější mikrosatelit jsem ve své diplomové práci označil lokus Patbel2, u kterého jsem popsal 12 alel (stejně jako u CAM-05). U tohoto lokusu jsem ve své bakalářské práci našel 4 alely. Tento velký rozdíl v počtu alel byl způsoben tím, že jsem ve své bakalářské práci u tohoto lokusu podcenil dobu elektroforetické separace PCR produktů, kterou jsem v diplomové práci navýšil z 90 na 240 minut. Z tohoto důvodu jsem ve své bakalářské práci některé alely označil chybně za shodné.

**Tabulka č. 8:** Informace o vzorcích čápa simbila (*C. abdimii*) testovaných v pracích Košatová (2020), Kopecký (2022) a tato práce.

Vzorek	Evidenční číslo	Pohlaví	Číslo jedince		
			Tato práce	Košatová (2020)	Kopecký (2022)
CA-2	423010	M	1	1	
CA-3	423001	M	2	2	1
CA-4	423015	M	3	3	
CA-5	423012	F	4	4	2
CA-6	423009	F	5	5	3
CA-7	423014	M	6	6	4
CA-8	423005	M	7		5
CA-9	423013	F	8		
CA-10	423011	M	9		
CA-146	423025	F	10		6

Legenda: M - samec, F - samice

Dále byly dohromady analyzovány pomocí programu Genepop 4.7.5 genotypy 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila pro celkem 93 polymorfních mikrosatelitů. 47 z těchto lokusů bylo popsáno v této diplomové práci a dalších 46 lokusů charakterizovala ve své diplomové práci Fišerová (2014), kdy tyto lokusy testovala na stejných jedincích jako já

(stejně číslování). Cílem bylo zjistit, zda se mezi jednotlivými dvojicemi těchto lokusů vyskytuje vazba. Program našel vazbu pouze u lokusů W<sub>sp</sub>17 a W<sub>sp</sub>18. Tuto vazbu již autorka popsala ve své práci a zjistila, že se jedná o stejný lokus, u kterého jsou jen rozdílně navržené páry primerů. Autorka doporučuje přednostně z této dvojice využívat lokus W<sub>sp</sub>17 z důvodu, že lokus W<sub>sp</sub>18 obsahoval nulové alely.

### **Srovnání výsledků této diplomové práce s původními publikacemi**

V rámci 47 polymorfních mikrosatelitů bylo 41 z nich původně popsáno u 21 druhů ze 7 řádů v celkem 24 publikacích, které jsou uvedeny pro každý lokus v kapitole č. 4 Materiál a metody. U těchto 41 polymorfních mikrosatelitů jsem porovnal teploty *annealingu* ( $T_A$ ) a počty alel ( $N_A$ ) mezi mou diplomovou prací a publikacemi, ve kterých byly tyto lokusy izolovány u zdrojových druhů - viz Tabulka č. 9. V porovnání s publikacemi byla  $T_A$  v mé práci vyšší u 10 lokusů o 1–3 °C, u 10 lokusů o 4–6 °C a u 12 lokusů o více než 6 °C. Oproti tomu byla  $T_A$  nižší u 3 lokusů o 1–3 °C, u 3 lokusů o 4–6 °C a u lokusu Paequ8 (Techow *et al.*, 2004) až o 14 °C. U lokusů Patbel2 (Quillfeldt *et al.*, 2012) a Pf36 (Riordan *et al.*, 2012) autoři neuvádějí  $T_A$ . V rámci porovnání počtu alel u lokusů mezi mou prací (10 čápů simbila) a původními publikacemi jsem u 2 lokusů detekoval více alel. Jednalo se o lokusy Ee20, kde jsem detekoval 5 alel a Dai *et al.* (2013) popsali 2 alely u 6 jedinců volavky žlutozobé, a Man27, kde jsem detekoval 3 alely a Boessenkool *et al.* (2008) popsali 2 alely u 43 jedinců tučňáka žlutookého. U dalších 4 lokusů jsem popsal stejně alel jako autoři v publikacích, jednalo se o De3 (Burg, 1999), Ee43 (Dai *et al.*, 2013), Ole10 (Bicknell *et al.*, 2011) a Ptero09 (Welch *et al.*, 2011). U zbylých lokusů jsem ve své práci popsal méně alel než v původních publikacích. To bylo způsobeno především menším počtem testovaných jedinců v mé práci oproti publikacím, ve kterých byly původně lokusy izolovány.

**Tabulka č. 9:** Porovnání výsledků testování 41 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila (tato práce) s publikacemi, v nichž byly tyto lokusy izolovány u zdrojových druhů. V tabulce je uveden název lokusu, zdrojový druh, počet testovaných jedinců (n), teplota *annealingu* (T<sub>A</sub>), počet alel (N<sub>A</sub>), literární zdroj a délka elektroforetické separace (t<sub>s</sub>).

Lokus	Zdrojový druh	n	T <sub>A</sub> [°C]	N <sub>A</sub>	Literární zdroj	Čáp simbil, 10 jedinců (tato práce)		
						T <sub>A</sub> [°C]	t <sub>s</sub> [min]	N <sub>A</sub>
11H7	Albatros stěhovavý	60	58	10	Dubois <i>et al.</i> , 2005	56	150	2
B102	Potápka západní	16	55	4	Humple, 2009	58	210	2
Bb21	Buřňák Bulwerův	91	60	3	Andris <i>et al.</i> , 2010	66	180	2
Calex-01	Kulík mořský	42	62	10	Küpper <i>et al.</i> , 2007	69	150	2
Cc10	Čáp bílý	213	60	7	Turjeman <i>et al.</i> , 2016	61	90	2
Cc42		213	60	7		67	225	6
Cc72		213	60	6		67	150	3
De3	Albatros stěhovavý	50	50	3	Burg, 1999	62	90	4
		90	54	3				
		50	54	4				
Ech007	Tučňák žlutorohý	28	60	18	Ahmed <i>et al.</i> , 2009	69	180	2
Ech011		27	60	8		66	90	3
Ech030		28	60	11		69	180	2
Ech036		28	60	16		69	150	5
Ee18	Volavka žlutozobá	6	58	7	Dai <i>et al.</i> , 2013	59	90	5
Ee20		6	56	2		58	250	5
Ee43		6	60	5		56	150	5
Em5	Tučňák nejmenší	*	60	8	Grosser <i>et al.</i> , 2015	59	90	3
Emm8		26	56	3	Billing <i>et al.</i> , 2007	61	150	2
G215	Potápka západní	15	60	5	Humple, 2009	55	90	2
Man27	Tučňák žlutooký	43	48	2	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008	60	90	3
Ole10	Buřňáček dlouhokřídý	24	60	3	Bicknell <i>et al.</i> , 2011	61	180	3
Ole21		24	60	21		64	120	2
Omn2	Buřňáček Monteirův	125	58	7	Bried <i>et al.</i> , 2012	60	180	2
Omn8		125	58	10		59	90	7
Omn25		125	58	5		61	180	3

Tabulka č. 9: Pokračování.

Lokus	Zdrojový druh	n	T <sub>A</sub> [°C]	N <sub>A</sub>	Literární zdroj	Číp simbil, 10 jedinců (tato práce)		
						T <sub>A</sub> [°C]	t <sub>s</sub> [min]	N <sub>A</sub>
<b>Pacbel_07265</b>		74	56	15		59	90	2
<b>Pacbel_16989</b>	Buřňák	75	56	10	Moodley <i>et al.</i> ,	63	90	2
<b>Pacbel_17944</b>	útlózobý	75	56	12	2015	68	90	2
<b>Pacbel_19907</b>		74	56	8		59	90	2
<b>Paequ8</b>	Buřňák bělobradý	77	58	3	Techow <i>et O’Ryan</i> , 2004	44	180	2
<b>Patbel2</b>	Buřňák útlózobý	68	*	16	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012	66	240	12
<b>Pc B109</b>	Buřňák	79	57	5	Hardesty <i>et al.</i> ,	66	120	2
<b>Pc D103</b>	světlenohý	84	59	6	2013	53	90	3
<b>Pf36</b>	Kormorán tasmánský	42	*	8	Riordan <i>et al.</i> , 2012	51	90	6
<b>Ptero02</b>	Buřňák	12	53	5	Welch <i>et</i>	65	150	4
<b>Ptero09</b>	havajský	12	53	7	Fleischer, 2011	60	150	7
<b>Puff G2C</b>	Buřňák baleárský	50	50	7	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009	55	90	2
<b>Pygantarc29</b>	Tučňák uzdičkový	23	65	3	Kang <i>et al.</i> , 2015	64	150	2
<b>RBG18M</b>	Racek novozélandský	12	53	5	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011	65	90	2
<b>Sh2Ca12</b>	Tučňák	24	60	6	Schlosser <i>et al.</i> , 2003	62	90	2
<b>Sh2Ca58</b>	Humboldtův	316	63	4	Schlosser <i>et al.</i> , 2009	66	90	3
<b>STAL18</b>	Albatros bělohřbetý	36	60	7	Hernandez <i>et al.</i> , 2014	63	150	3

Legenda: teplota *annealingu* byla u lokusu v mé práci oproti publikacím: vyšší o 1–3 °C - světle zelená, vyšší o 4–6 °C - zelená, vyšší o více než 6 °C - tmavě zelená, nižší o 1–3 °C - světle červená, nižší o 4–6 °C - červená, nižší o více než 6 °C - tmavě červená; \* - autoři pro tento lokus neuvádějí tuto informaci; počet alel byl u lokusu v mé práci oproti publikaci: nižší - oranžová, stejný - hnědá, vyšší - modrá; žlutá barva - u lokusu nelze porovnat tento parametr

Zbýlých 6 polymorfních lokusů popsanych v této práci byly EST a konzervované ptačí mikrosatelity, které popsali ve dvou publikacích Dawson *et al.* (2010, 2013) na 4–12 jedincích zebříčky pestré (*T. guttata*) a 4 jedincích kura bankivského (*G. gallus*). Tito autoři měli za cíl popsat takové mikrosatelity, které budou přenositelné v rámci většího

spektra druhů ptáků. To lze dosáhnout tím, že mikrosatelit bude ležet v oblasti genu, kde jsou tyto sekvence konzervativnější, neboli kdy je tato sekvence podobná pro mnoho druhů. Konzervativnost mikrosatelitů v kódujících oblastech genomu u ptáků potvrdili i ve své studii Feng *et al.* (2023). Z tohoto důvodu jsem ověřil umístění všech 6 mikrosatelitů v genomu ptáků pomocí programu BLASTN 2.15.0 (Zhang *et al.*, 2000), kdy všechny tyto lokusy ležely v oblastech genů a jejich produkty podle anotací v GenBank souvisí s přenosem buněčných signálů nebo regulací transkripce. Dále jsem u těchto lokusů srovnal teploty *annealingu* ( $T_A$ ) a počty alel ( $N_A$ ) mezi mou diplomovou prací a oběma publikacemi Dawson *et al.* (2010, 2013) - viz Tabulka č. 10. Pouze u lokusu CAM-05 byla v mé práci  $T_A$  nižší než v uvedené publikaci. U zbylých lokusů byla v mé práci  $T_A$  vyšší o 5–11 °C než v obou publikacích. V rámci počtu alel jsem u lokusů CAM-05, TG01-148 a TG11-011 detekoval více alel. To bylo způsobeno nižším počtem testovaných jedinců v původních publikacích.

**Tabulka č. 10:** Porovnání výsledků testování 6 EST a konzervovaných ptačích polymorfních mikrosatelitních lokusů u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila (tato práce) s publikacemi, v nichž byly tyto lokusy popsány. V tabulce je uveden název lokusu, teplota *annealingu* ( $T_A$ ), počet alel ( $N_A$ ), počet testovaných jedinců na daný lokus (P) a délka elektroforetické separace ( $t_s$ ).

Lokus	Dawson <i>et al.</i> (2010, 2013)	Zebříčka	Kur	Čáp simbil, 10 jedinců (tato práce)		
	$T_A$ [°C]	$N_A$ (P)	$N_A$ (P)	$T_A$ [°C]	$t_s$ [min]	$N_A$
CAM-05	56	6 (7)	2 (4)	51	180	12
CAM-11	56	6 (12)	M (4)	67	90	4
CAM-24	56	6 (12)	M (4)	62	90	2
TG01-077	58	3 (4)	2 (4)	66	90	3
TG01-148	56	2 (4)	M (4)	61	180	3
TG11-011	52	2 (4)	M (4)	60	150	3

Legenda: M - monomorfní lokus

### Testované mikrosatelity u čápa simbila

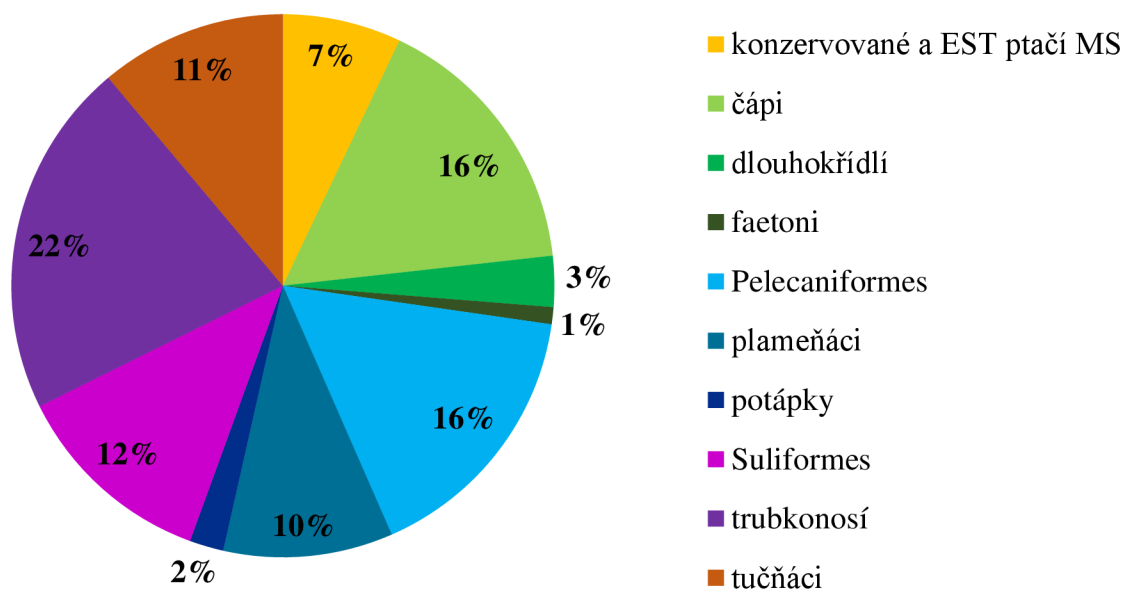
Hledáním a analýzou *cross-species* polymorfních mikrosatelitů u čápa simbila se zabývalo v rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci celkem 6 prací (Nevimová, 2012; Novosadová, 2012; Fišerová, 2014; Košatová, 2020; Kopecký, 2022 a tato diplomové práce). Celkem u tohoto druhu bylo testováno 836 *cross-species*



mikrosatelitních lokusů, které byly původně popsány u druhů z celkem 12 řádů. Toto hodnocení respektuje současnou systematika ptáků podle Gill *et* Donsker (2024), zatímco Nevimová (2012), Novosadová (2012) a Fišerová (2014) používaly staré pojetí ptačího systému, který v této diplomové práci byl převeden na aktuální. Jednalo se o řády: čápi (Ciconiiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes), faetoni (Phaethontiformes), Pelecaniformes, pěvci (Passeriformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes), potáplice (Gaviiformes), Suliformes, trubkonosí (Procellariiformes), tučňáci (Sphenisciformes) a vrubozobí (Anseriformes). Některé lokusy byly také EST a konzervované ptačí mikrosatelity. Testováním těchto 836 lokusů bylo nalezeno celkem 99 polymorfních mikrosatelitů, tedy úspěšnost nalezení polymorfního lokusu byla 11,84 %. Dále 92 z těchto lokusů plně charakterizovala na 10 nepříbuzných jedincích čápa simbila Fišerová (2014) a tato práce. U 7 zbylých lokusů se nepodařilo vyhodnotit genotypy pro tyto jedince. Jedná se o lokusy Cc04, PM2-68, PrD3 a WS6 (Fišerová, 2014) a o lokusy Em23, Ole19 a TG04-061 z této práce. Rozdělení všech testovaných a polymorfních lokusů u čápa simbila podle řádů, z nichž byly původně izolovány, je uvedeno v Tabulce č. 11. Procentuální zastoupení 99 polymorfních lokusů u čápa simbila rovněž podle zdrojového řádu je znázorněno na Obrázku č. 8.

**Tabulka č. 11:** Rozdělení všech 836 testovaných *cross-species* mikrosatelitních lokusů u čápa simbila podle zdrojového řádu. V tabulce je uveden zdroj lokusů, počet testovaných ( $N_L$ ) a polymorfních ( $N_P$ ) lokusů

Zdroj lokusů (řád)	$N_L$	$N_P$	Zdroj lokusů (řád)	$N_L$	$N_P$
konzervované a EST ptačí MS	60	7	potápky	18	2
čápi	46	16	potáplice	7	0
dlouhokřídli	7	3	Suliformes	131	12
faetoni	11	1	trubkonosí	207	21
Pelecaniformes	175	16	tučňáci	113	11
pěvci	1	0	vrubozobí	13	0
plameňáci	47	10			



**Obrázek č. 8:** Procentuální zastoupení 99 polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila, vzhledem k jejich zdrojovému řádu.

### Úspěšnost hledání polymorfních mikrosatelitů u čápa bílého, černého a simbila

V rámci prací, které byly vedeny pod Laboratoří populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL, byly porovnány úspěšnosti hledání polymorfních mikrosatelitů u čápa bílého, černého a simbila. U čápa bílého se jednalo o práce: Obručová (2009), Burianová (2011), Fišerová (2014), Gajdošíková (2020), Krňávková (2023) a Macková (2023) a u čápa černého o práce: Navrátilová (2009), Cahlíková (2011) a Musilová (2022, osobní sdělení). Práce, které hledaly polymorfní lokusy u čápa simbila, byly již uvedeny v této práci. Toto srovnání jsem udělal po jednotlivých zdrojových řádech, ze kterých bylo testováno alespoň 20 mikrosatelitních lokusů. Jednalo se o řády: čápi, Pelecaniformes, plameňáci, Suliformes, trubkonosí a tučňáci. K těmto řádům byla také přidána skupina konzervovaných a EST ptačích mikrosatelitů. Výsledky testování mikrosatelitů pro všechny 3 druhy čápů v rámci těchto 7 zdrojových skupin jsou v Tabulce č. 12. Z těchto 7 zdrojových skupin bylo testováno u čápa bílého 736 mikrosatelitních lokusů, kdy 72 bylo polymorfních neboli úspěšnost hledání polymorfního lokusu byla 9,78 %. U čápa černého nebyly testovány mikrosatelity od řádu tučňáci a konzervované a EST ptačí mikrosatelity. Z tohoto důvodu jsou pro tento druh porovnány pouze mikrosatelity z 5 zdrojových řádů. U čápa černého bylo 42 z 574 mikrosatelitů polymorfních neboli úspěšnost nalezení polymorfního lokusu byla 7,31 %.

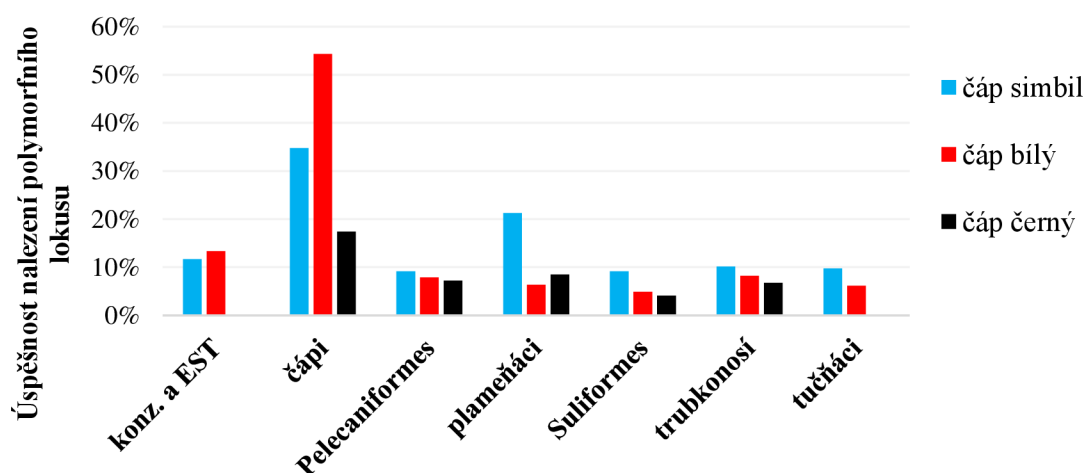
U čápa simbila byly testovány mikrosatelity za všech 7 zdrojových skupin, kdy 93 ze 779 lokusů bylo polymorfních neboli úspěšnost hledání polymorfního lokusu byla 11,93 %.

**Tabulka č. 12:** Výsledky testování mikrosatelitů u čápa bílého, černého a simbila v rámci 7 zdrojových skupin.

Zdroj mikrosatelitů (řád)	Počet testovaných / polymorfních lokusů		
	Čáp bílý	Čáp černý	Čáp simbil
konzervované a EST ptačí MS	60 / 8	*	60 / 7
čápi	35 / 19	46 / 8	46 / 16
Pelecaniformes	152 / 12	152 / 11	175 / 16
plameňáci	47 / 3	47 / 4	47 / 10
Suliformes	122 / 6	122 / 5	131 / 12
trubkonosí	207 / 17	207 / 14	207 / 21
tučňáci	113 / 7	*	113 / 11

Legenda: \* - tyto mikrosatelity dosud nebyly testovány u čápa černého

Úspěšnost nalezení polymorfního lokusu u všech 3 druhů čápů v rámci 7 zdrojových skupin byla nejvyšší u mikrosatelitů od druhů z řádu čápi. U těchto mikrosatelitů byla tato úspěšnost nejvyšší u čápa bílého, a to 54,29 %. To bylo způsobeno převážně tím, že 13 z 36 testovaných lokusů bylo původně izolováno pro tento druh. U 5 ze 7 zdrojových skupin byla nejvyšší úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitu u čápa simbila. Za povšimnutí stojí více než dvojnásobná šance nalezení polymorfního lokusu u čápa simbila pro mikrosatelity od řádu plameňáci oproti zbylým dvěma čápům. Shrnutí úspěšností pro nalezení polymorfního lokusu u všech 3 druhů čápů v rámci 7 zdrojových skupin je na Obrázku č. 9.

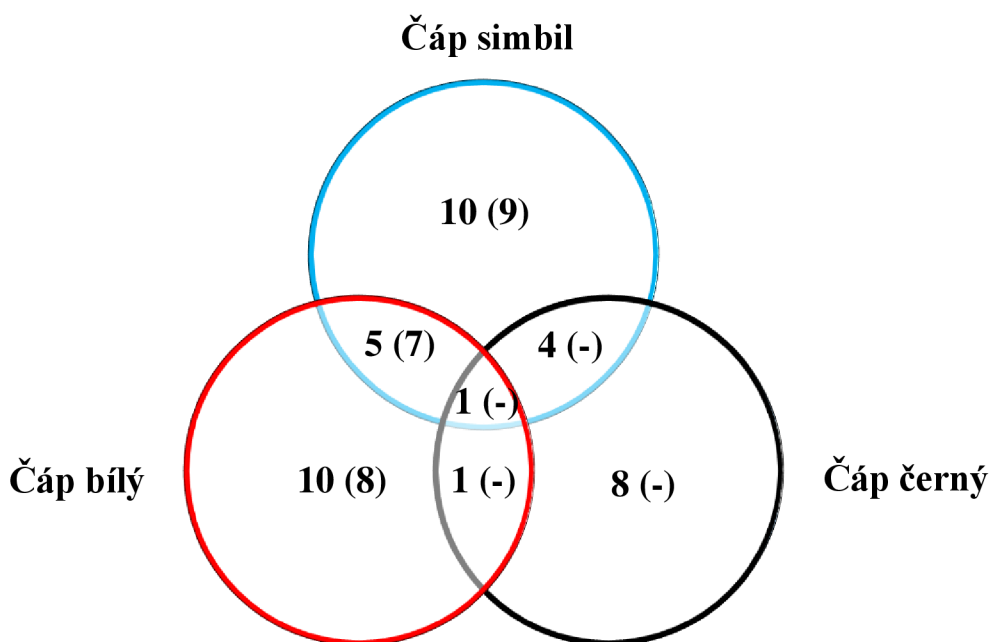


**Obrázek č. 9:** Úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů u čápa bílého, černého a simbila v rámci 7 zdrojových skupin, u nichž byly tyto lokusy původně popsány.

## **Polymorfní mikrosatelity od z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervované ptačí mikrosatelity u čápa bílého, černého a simbila**

V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL bylo alespoň u dvou ze tří druhů z rodu *Ciconia* (čáp bílý, černý a simbil) celkem otestováno 380 mikrosatelitních lokusů, kdy 207 z nich bylo původně popsáno u zástupců z řádu trubkonosí, dalších 113 lokusů od zástupců z řádu tučňáci a zbylých 60 lokusů byly konzervované a EST ptačí mikrosatelity. U čápa bílého bylo nejdříve otestováno všech 380 mikrosatelitů na 6 nepříbuzných jedincích (Gajdošíková, 2020; Krňávková, 2021) a poté 32 vybraných polymorfních lokusů bylo charakterizováno na 23 nepříbuzných jedincích (Krňávková, 2023; Macková, 2023). U čápa černého bylo pouze otestováno 207 mikrosatelitů od zástupců z řádu trubkonosí na 6 nepříbuzných jedincích (Musilová, 2022) a následně 14 vybraných polymorfních lokusů bylo charakterizováno na 24 nepříbuzných jedincích (Musilová, osobní sdělení). U čápa simbila bylo stejně jako u čápa bílého otestováno 380 mikrosatelitů na 6 nepříbuzných jedincích (Kořatová, 2020; Kopecký, 2022) a poté 36 vybraných polymorfních lokusů bylo charakterizováno na 10 nepříbuzných jedincích (tato práce).

Při srovnání charakterizovaných polymorfních mikrosatelitů od zástupců z řádu trubkonosí mezi čápem simbilem a zbylými dvěma druhy, měl tento druh nejvíce společných polymorfních lokusů s čápem bílým (5 lokusů). Čáp simbil s čápem černým měl o jeden společný polymorfní lokus méně. Čáp bílý a černý měl společně pouze polymorfní lokus Paequ10. Všechny tři druhy měly polymorfní lokus Omn8. Porovnání charakterizovaných polymorfních mikrosatelitů od zástupců z řádu tučňáci a konzervovaných a EST ptačích mikrosatelitů nelze provést pro všechny 3 druhy, z důvodu netestování těchto lokusů u čápa černého. Čáp bílý a simbil v rámci těchto mikrosatelitů měli společně polymorfních 7 lokusů. Srovnání charakterizovaných polymorfních mikrosatelitů pocházejících od 3 zdrojových skupin u čápa bílého, černého a simbila je na Obrázku č. 10. V Příloze č. 2. jsou uvedeny všechny mikrosatelity od zástupců z řádu trubkonosí a tučňáci a konzervované ptačí mikrosatelity, kdy tyto lokusy byly polymorfní alespoň u jednoho ze tří čápů.



**Obrázek č. 10:** Charakterizované polymorfní mikrosatelity pocházející od druhů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervované ptačí mikrosatelity, kdy tyto lokusy byly polymorfní u čápa bílého (Krňávková, 2023; Macková, 2023), černého (Musilová, osobní sdělení) a simbila (tato práce). Čísla udávají počet mikrosatelitních lokusů od zástupců z řádu trubkonosí, kdy tyto lokusy byly polymorfní u jednoho, dvou nebo tří druhů čápů současně. Čísla v závorce udávají počet mikrosatelitů od zástupců z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů, kdy tyto lokusy byly polymorfní u čápa bílého nebo simbila, anebo u obou druhů současně.

### **Srovnání polymorfních mikrosatelitů z řádů dlouhokřídlí, trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa simbila s dalšími testovanými druhy z kladu Aequorlitorornithes**

V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL byly polymorfní mikrosatelity od zástupců z řádů dlouhokřídlí, trubkonosí a tučňáci a konzervované ptačí mikrosatelity, které byly charakterizované v této práci, také testovány v mnoha pracích u dalších 10 druhů vodních ptáků. Kromě čápa bílého (Krňávková, 2023; Macková 2023) a černého (Musilová, osobní sdělení), se též jedná o nesyta indomalajského (Pechová, 2014; Nedvědová, 2015), pelikána afrického (Kopečná, 2020), bílého (Adámková, 2021; Kremlová, 2021), kadeřavého (Verešová, 2020; Daňková, sdělení vedoucího práce) a skvrnozobého (Šuláková, 2017; Macková, 2021), plameňáka karibského (Strejčková, 2018; Šuláková, 2019) a růžového (Verešová, 2020; Zlochová, 2019) a o potápku roháče (Janušová, 2017).

Při porovnání polymorfních mikrosatelitů u čápa simbila s ostatními 10 druhy byly lokusy CAM-24 a Omn8 monomorfní pouze u jednoho ze zmíněných druhů. Naopak lokusy Ech036, Em5, Ole10, Pygantarc29, RBG18M, Sh2Ca58 a TG01-077 byly polymorfní pouze u čápa simbila. Dále jsem provedl srovnání 8 polymorfních lokusů, u kterých jsem detekoval u čápa simbila alespoň 4 alely, se zbylými 10 druhy ptáků - viz Tabulka č. 13. V průměru u 6 z 10 druhů byly tyto lokusy monomorfní. Nejvíce společných polymorfních lokusů s čápem simbila měl nesyt indomalajský (6) a čáp bílý (5). Naopak nejméně současně polymorfních lokusů s čápem simbila měl čáp černý (1) a pelikán kadeřavý (žádný).

**Tabulka č. 13:** Srovnání mikrosatelitů z řádů dlouhokřídlí, trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů, které byly polymorfní u 10 nepříbuzných jedinců čápa simbila (tato práce) a současně byly polymorfní u dalších 10 druhů z kladu Aequorlitorornithes. Jedná se o čápa bílého (Krnávková, 2023; Macková 2023) a černého (Musilová, osobní sdělení), nesyta indomalajského (Pechová, 2014; Nedvěďová, 2015), pelikána afrického (Kopečná, 2020), bílého (Adámková, 2021; Kremlová, 2021), kadeřavého (Verešová, 2020; Daňková, sdělení vedoucího práce) a skvrnozobého (Šuláková, 2017; Macková, 2021), plameňáka karibského (Strejčková, 2018; Šuláková, 2019) a růžového (Verešová, 2020; Zlochová, 2019) a o potápku roháče (Janušová, 2017). Číslem je označen počet alel a číslem v závorce počet testovaných jedinců.

Mikrosatelitní lokus	Ci ab (10)	Ci ci (23)	Ci ni (24)	My le (6)	Pe cr (41)	Pe on (21)	Pe ph (6)	Pe ru (12)	Ph ru (30)	Ph ro (22)	Po cr (13)
<b>CAM-05</b>	12	2	-	M	M*	M	5	M	M	M	5
<b>CAM-11</b>	4	2	-	5	M*	3	2	M	3	2	M
<b>De3</b>	4	M	M	4	M	M	M	M	4	3	M
<b>Ech36</b>	5	M	-	M	M*	M	M	M	M	M	M
<b>Omn8</b>	7	6	3	4	M	7	4	4	7	8	9
<b>Patbel2</b>	12	M	M	5	M	5	3	2	M	M	M
<b>Ptero02</b>	4	4	M	5	M	M	M	M	M	M	M
<b>Ptero09</b>	7	4	M	2	M	4	M	M	M	M	M

Legenda: Ciab - čáp simbil; Cici - čáp bílý; Cini - čáp černý; Myle - nesyt indomalajský; Pecr - pelikán kadeřavý; Peon - pelikán bílý; Peph - pelikán skvrnozobý; Peru - pelikán africký; Phru - plameňák karibský; Phro - plameňák růžový; Pocr - potápka roháč; \* - lokus byl testován na 6 nepříbuzných jedincích; M - monomorfní lokus

V rámci budoucího hledání a analýzy polymorfních mikrosatelitů v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL bych doporučil otestovat u čápa bílého 11 mikrosatelitů, které jsou popsány pro tento druh v práci

Turjeman *et al.* (2016). Dále u čápa černého chybí otestovat 113 mikrosatelitů od zástupců z řádu tučňáci a 60 konzervovaných ptačích mikrosatelitů - těchto všech 173 lokusů bylo například testováno v práci Košatová (2020) na čápu simbilovi nebo v práci Gajdošíková (2020) na čápu bílém. Také u čápa bílého a černého není stále otestováno 7 mikrosatelitů od kormorána tasmánského publikovaných Riordan *et al.* (2012) a 23 lokusů od volavky žlutozobé popsanych Dai *et al.* (2013), kdy všech těchto 30 lokusů jsem také nově testoval v této práci. Nakonec bych doporučil otestovat u čápa bílého, černého a simbila 5 mikrosatelitů od marabua afrického, které popsal ve své práci Ferrie *et al.* (2013), kde by mohla být vysoká šance nalezení polymorfního lokusu.

## 7 Závěr

V rámci diplomové práce jsem analyzoval a charakterizoval 47 polymorfních mikrosatelitních lokusů na 10 nepříbuzných jedincích čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Tyto lokusy byly dříve označeny jako polymorfní v práci Košatová (2020) a v mé bakalářské práci (Kopecký, 2022), kde tyto lokusy byly testovány v obou pracích na 6 nepříbuzných jedincích čápa simbila, a byly původně popsány u zástupců z řádu trubkonosí a tučňáci a také jako konzervované a EST ptačí mikrosatelity. Z analýzy jsem vyřadil celkem 9 mikrosatelitů, protože 6 bylo monomorfních a u 3 se mi nepodařil určit počet alel.

V této diplomové práci bylo také nově otestováno na 10 nepříbuzných jedincích čápa simbila 68 párů primerů pro mikrosatelitní lokusy, které pocházely od čápa bílého, potápky západní a od zástupců z řádů Pelecaniformes, plameňáci a Suliformes. Tímto testováním jsem našel 9 nových polymorfních mikrosatelitů, kdy 3 lokusy pocházely od čápa bílého (*Ciconia ciconia*), 1 od kormorána tasmánského (*Phalacrocorax fuscescens*), 2 od potápky západní (*Aechmophorus occidentalis*) a 3 od volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*).

Celkem jsem v této práci plně charakterizoval na 10 jedincích čápa simbila 47 polymorfních mikrosatelitních lokusů, u kterých jsem našel 2 až 12 alel. Genotypy 10 jedinců pro tyto mikrosatelity jsem dále analyzoval pomocí programů Cervus 3.0.7 a Genepop 4.7.5 k získání populačně-genetických parametrů pro tyto lokusy a k otestování vazby mezi nimi, kdy žádný z lokusů nebyl ve vazbě.

V současnosti u čápa simbila je popsáno 99 nezávislých *cross-species* polymorfních mikrosatelitních markerů, kdy 92 z nich je plně charakterizováno na 10 nepříbuzných jedincích čápa simbila. Pro další nalezení polymorfních mikrosatelitů u tohoto druhu bych doporučoval otestovat 5 mikrosatelitních lokusů popsaných Ferrie *et al.* (2013) na marabu africkém, kde by mohla být vysoká šance nalezení polymorfního lokusu.



## 8 Literatura

- Abu Shnaf, A. S. M., Al-Khalifa, M. S. (2023): First constitutive heterochromatin characterization and karyotype of white stork *Ciconia ciconia* (Aves: Ciconiidae). *Brazilian Journal of Biology* 83, 1–7.
- Adavoudi, R., Pilot, M. (2021): Consequences of hybridization in mammals: A systematic review. *Genes* 13, 50.
- Adámková, V. (2021): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Ahmed, S., Hart, T., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Trathan, P. N., Rogers, A. D. (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources* 9, 1530–1535.
- Amat, J. A., Green, A. J. (2010): Waterbirds as bioindicators of environmental conditions. In: Hurford, C., Schneider, M., Cowx, I. (eds.): *Conservation Monitoring in Freshwater Habitats: A practical guide and case studies*. Springer, Dordrecht, 45–52.
- Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*. Manuskript. [online] [navštíveno 7. 2. 2024] Dostupné z <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>.
- Arcot, S. S., Wang, Z., Weber, J. L., Deininger, L., Batzer, M. A. (1995): Alu repeats: A source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics* 29, 136–144.
- Bagshaw, A. T. M. (2017): Functional mechanisms of microsatellite DNA in eukaryotic genomes. *Genome Biology and Evolution* 9, 2428–2443.
- Belterman, R. H. R., De Boer, L. E. M. (1984): A karyological study of 55 species of birds, including karyotypes of 39 species new to cytology. *Genetica* 65, 39–82.
- Belterman, R. H. R., De Boer, L. E. M. (1990): A miscellaneous collection of bird karyotypes. *Genetica* 83, 17–29.

- Bhargava, A., Fuentes, F. F. (2010): Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology* 44, 250–266.
- 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.
- Billing, T. M., Guay, P. J., Peucker, A. J., Mulder, R. A. (2007): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the study of paternity and population structure in the little penguin *Eudyptula minor*. *Molecular Ecology Notes* 7, 425–427.
- BirdLife International (2016): *Ciconia abdimii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. [online] [navštíveno 16. 1. 2024] Dostupné z <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22697673A93629659.en>.
- BirdLife International (2023): *Mycteria cinerea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2023. [online] [navštíveno 14. 1. 2024] Dostupné z <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T22697651A183200130.en>.
- Boessenkool, S., King, T. M., Seddon, P. J., Waters, J. M. (2008): Isolation and characterization of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources* 8, 1043–1045.
- Bried, J., Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and 48 cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*. Manuskript. [online] [navštíveno 7. 2. 2024] Dostupné z <https://www.yumpu.com/en/document/view/39976169>.
- Brown, L. H., Urban, E. K., Newman, K. (1993): The birds of Africa. Vol. 1. Academic Press, London, 172–190.
- Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009): Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology* 150, 925–929.

- Burleigh, J. G., Kimball, R. T., Braun, E. L. (2015): Building the avian tree of life using a large-scale, sparse supermatrix. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 84, 53–63.
- Burg, T. M., (1999) Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology* 8, 338–341.
- Burianová, E. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Buschiazzo, E., Gemmell, N. J. (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays* 28, 1040–1050.
- Cahlíková, R. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Campanini, E. B., Sanches, A., Hatanaka, T., del Lama, S. N. (2012): Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from cattle egret (*Bulbulcus ibis*) and cross-amplification in other Ardeidae species. *Conservation Genetic Resources* 4, 707–709.
- Coenye, T., Vandamme, P. (2005). Characterization of mononucleotide repeats in sequenced prokaryotic genomes. *DNA Research* 12, 221–233.
- Dai, Y., Zhou, X., Fang, W., Lin, Q., Chen, X. (2013): Development and cross-species transferability of 23 microsatellite markers from the vulnerable Chinese Egret (*Egretta eulophotes*) using 454 sequencing. *Conservation Genetics Resources* 5, 1035–1038.
- Davis, L. M., Glenn, T. C., Elsey, R. M. *et al.* (2000): Genetic structure of six populations of American alligators: A microsatellite analysis. *Crocodylian Biology and Evolution*. 38–50.
- Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I. R. K., Horsburgh, G. J., Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics* 14, 176.

- Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., 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.
- de Boer, L. E. M., Van Brink, J. M. (1982): Cytotaxonomy of Ciconiiformes (Aves), with karyotypes of eight species new to cytology. *Cytogenetics and Cell Genetics* 34, 19–34.
- de Oliveira, T. D., Kretschmer, R., Bertocchi, N. A., Degrandi, T. M., de Oliveira, E. H. C., Cioffi, M. d. B., Garnero, A. d. V., Gunski, R. J. (2017): Genomic organization of repetitive DNA in woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for karyotype and ZW sex chromosome differentiation. *PLoS ONE* 12.
- de Sousa, R. P. C., Campos, P. S. B., dos Santos, M. d. S., O'Brien, P. C., Ferguson-Smith, M. A., de Oliveira, E. H. C. (2023): Cytotaxonomy and molecular analyses of *Mycteria americana* (Ciconiidae: Ciconiiformes): Insights on stork phylogeny. *Genes* 14, 816.
- de Souza, M. S., Kretschmer, R., Barcellos, S. A., Costa, A. L., Cioffi, M. D., de Oliveira, E. H., Garnero, A. D., Gunski, R. J. (2020): Repeat sequence mapping shows different W chromosome evolutionary pathways in two Caprimulgiformes families. *Birds* 1, 19–34.
- del Hoyo, J. (ed.) (2020): *All the Birds of the World*. Lynx Edicions, Barcelona.
- In: Rodríguez-Rodríguez, E. J., Negro, J. J. (2021): Integumentary colour allocation in the stork family (Ciconiidae) reveals short-range visual cues for species recognition. *Birds* 2, 138–146.
- del Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J. (1992): *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 1. Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona, 436–465.
- Degrandi, T. M., Barcellos, S. A., Costa, A. L., Garnero, A. D. V., Hass, I., Gunski, R. J. (2020): Introducing the bird chromosome database: An overview of cytogenetic studies in birds. *Cytogenetic and Genome Research* 160, 199–205.
- Dieringer, D., Schlotterer, C. (2003): Microsatellite Analyser (MSA): A platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3, 167–169.

- Dubois M. P., Jarne P., Jouventin P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes* 5, 905–907.
- Ellegren, H. (2000): Microsatellite mutations in the germline: Implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* 16, 551–558.
- Ellegren, H. (2004): Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5, 435–445.
- Elliott, A., Christie, D. A., Garcia, E. F. J., Boesman, P. F. D. (2020): Abdim's stork (*Ciconia abdimii*). [online] [navštíveno 28. 1. 2024] Dostupné z <https://birdsoftheworld.org/>
- Ericson, P. G. P., Anderson, C. L., Britton, T., Elzanowski, A., Johansson, U. S., Källersjö, M., Ohlson, J. I., Parsons, T. J., Zuccon, D., Mayr, G. (2006): Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters* 2, 543–547.
- Estoup, A., Angers, B. (1998): Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. In: G. R. Carvalho (ed.): *Advances in Molecular Ecology*. IOS Press, Washington, D.C., 55–86.
- Feng, K., Zhou, C., Wang, L., Zhang, C., Yang, Z., Hu, Z., Yue, B., Wu, Y. (2023): Comprehensive comparative analysis sheds light on the patterns of microsatellite distribution across birds based on the chromosome-level genomes. *Animals* 13, 655.
- Ferrie, G. M., Cohen, O. R., Schutz, P., Leighty, K. A., Plasse, C., Bettinger, T. L., Hoffman, E. A. (2013): Identifying parentage using molecular markers: Improving accuracy of studbook records for a captive flock of marabou storks (*Leptoptilos crumeniferus*). *Zoo Biology* 32, 556–564.
- Fišerová, E. (2014): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), černého (*C. nigra*) a simbila (*C. abdimii*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Gaisler, J., Zima, J. (2018): *Zoologie obratlovců*. Vydání 3., přepracované. Academia, Praha, 463–488.

- Gajdošíková, T. (2020): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Geraci, J., Gaillard, M., Bechet, A., Cezilly, F., Wattier, R. A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). Molecular Ecology Resources, preprint.
- Gill, F., Donsker, D. (2024): IOC World Bird list (v14.1). [online] [navštíveno 24. 1. 2024] Dostupné z <https://www.worldbirdnames.org/bow/storks/>
- Goldstein, D. B., Schlotterer, C. (1999): Microsatellites: Evolution and applications. Oxford University Press, Oxford.
- 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.
- Grosser, S., Waters, J. M. (2015): Development and characterisation of 20 novel microsatellite markers for the little blue penguin (*Eudyptula minor*) using next-generation sequencing. Conservation Genetics Resources 7, 143–145.
- 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-L., Harshman, J., Huddleston, C. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, C. C., Yuri, T. (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. Science 320, 1763–1768.
- Hancock, J. M. (1999): Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein D. B., Schlotterer, C. (eds.): Microsatellites: Evolution and applications. Oxford University Press, Oxford, 1–9.
- 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.
- Hodel, R. G. J., Segovia-Salcedo, M. C., Landis, J. B., Crowl, A. A., Sun, M., Liu, L., Gitzendanner, M. A., Douglas, N. A., Germain-Aubrey, C. C., Chen, S., Soltis, D. E., Soltis, P. S. (2016): The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. *Applications in Plant Sciences* 4, 1–13.
- Hudec, K., Šťastný, K., Cepák, J., Čihák, K., Honza, M., Hořák, D., Hromádka, M., Klvaňa, P., Musil, P., Musilová, Z. (2016): Ptáci - Aves. Díl I. Vydání 3., přepracované a doplněné. Academia, Praha, 577–579.
- Hughes, A. L., Hughes, M. K. (1995): Small genomes for better flyers. *Nature* 377, 391.
- Hughes, A. L., Piontkivska, H. (2005): DNA repeat arrays in chicken and human genomes and the adaptive evolution of avian genome size. *BMC Evolutionary Biology* 5, 12.
- Humple, D. L. (2009): Genetic structure and demographic impacts of oil spills in western and Clark's grebes. Diplomová práce, Depon in: Sonoma State University, Rohnert Park.
- Hyun-Ju, Y., Mu-Yeong, L., Hye-Sook, J., Junghwa, An., Jongmin, Y. (2023): Temporal changes in demography and genetic diversity of oriental storks and the stage of long-term captive propagation and reintroduction initiation. *Zoological Science* 40, 284–291.
- IUCN. (2023): The IUCN Red List of Threatened Species. Verze 2023-1. [online] [navštíveno 24. 1. 2024] Dostupné z <https://www.iucnredlist.org>.
- 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.
- Jensen, F. P., Falk, K., Petersen, B. S. (2006): Migration routes and staging areas of Abdim's Storks *Ciconia abdimii* identified by satellite telemetry. *Ostrich* 77, 210–219.

- Kalinowski, S., Taper, M., Marshall, T. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16, 1099–1106.
- Kaminsin, D., Warrit, N., Sankhom, R., Piamsanga, K., Sanannu, S., Baicharoen, S., Wiwegweaw, A. (2023): Detecting introgressive hybridization to maintain genetic integrity in endangered large waterbird: a case study in milky stork. *Nature - Scientific Reports* 13, 8892.
- Kang, S., Jung, J. W., Ahn, D. H., Lee, J. E., Kim, J. H., Park, H. (2015): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the chinstrap penguin, *Pygoscelis antarctica*. *Conservation Genetics Resources* 7, 561–563.
- Katti, M. V., Ranjekar, P. K., Gupta, V. S. (2001): Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution* 18, 1161–1167.
- Kimball, R. T., Oliveros, C. H., Wang, N., White, N. D., Barker, F. K., Field, D. J., Ksepka, D. T., Chesser, R. T., Moyle, R. G., Braun, M. J., Brumfield, R. T., Faircloth, B. C., Smith, B. T., Braun, E. L. (2019): A phylogenomic supertree of birds. *Diversity* 11, 109.
- Kolodner, R. D., Marsischky, G. T. (1999): Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinions in Genetics and Development* 9, 89–96.
- Kopecký, O. (2022): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kopečná, K. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Košatová, K. (2020): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kremlová, H. (2021): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána bílého



- (*Pelecanus onocrotalus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kretschmer, R., de Oliveira, T., Furo, I., Silva, F., Gunski, R., Garnero, A., Cioffi, M., de Oliveira, E., Freitas, T. (2018a): Repetitive DNAs and shrink genomes: A chromosomal analysis in nine Columbidae species (Aves, Columbiformes). *Genetics and Molecular Biology* 41, 98–106.
- Kretschmer, R., Ferguson-Smith, M., de Oliveira, E.H. (2018b): Karyotype evolution in birds: from conventional staining to chromosome painting. *Genes* 9, 181.
- Kretschmer, R., Rodrigues, B. S., Barcellos, S. A., Costa, A. L., Cioffi, M. D., Garnero, A. D., Gunski, R. J., de Oliveira, E. H., Griffin, D. K. (2021): Karyotype Evolution and genomic organization of repetitive DNAs in the saffron finch, *Sicalis flaveola* (Passeriformes, Aves). *Animals* 11, 1456.
- 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.
- Krňávková, P. (2023): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce. PřF UPOL, Olomouc.
- Kuhl, H., Frankl-Vilches, C., Bakker, A., Mayr, G., Nikolaus, G., Boerno, S. T., Klages, S., Timmermann, B., Gahr, M. (2021): An unbiased molecular approach using 3'UTRs resolves the avian family-level tree of life. *Molecular Biology and Evolution* 38, 108–127.
- Kushlan, J. A. (1993): Colonial waterbirds as bioindicators of environmental change. *Colon. Waterbirds* 16, 223–251.
- Leonard, J. A., Echegaray, J., Randi, E., Vilà, C. (2014): Impact of hybridization with domestic dogs on the conservation of wild canids. In: Gompper, M. E. (ed.): *Free Ranging Dogs and Wildlife Conservation*. Oxford University Press. 170–184. [online] [navštíveno 22. 2. 2024] Dostupné z <https://doi.org/10.1093/acprof:osobl/9780199663217.003.0007>

- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002a): Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Molecular Ecology* 11, 2453–2465.
- Li, Y. C., Röder, M. S., Fahima, T. (2002b): Climatic effect on microsatellite diversity in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, at Yehudiyya microsite, Israel. *Heredity* 89, 127–132.
- Longmire, J. L., Maltbie, M., Baker, R. J. (1997): Use of “lysis buffer“ in DNA isolation and its implication for museum collections. *Occasional Papers of the Museum of Texas Tech University* 163, 1–3.
- 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.
- Macková, B. (2023): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce. PřF UPOL, Olomouc.
- Matsubara, K., O’Meally, D., Azad, B., Georges, A., Sarre, S. D., Graves, J. A. M., Matsuda, Y., Ezaz, T. (2016): Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in Sauropsida. *Chromosoma* 125, 111–123.
- Mayr, G. (2011): Metaves, Mirandornithes, Strisores and other novelties - a critical review of the higher-level phylogeny of neornithine birds. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49, 58–76.
- Mercer, D. M., Haig, S. M., Mullins, T. D. (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources* 2, 119–121.
- Messier, M., Li, S. H., Stewart, C. B. (1996): The birth of microsatellites. *Nature* 381, 483.
- 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.
- Musilová, K. (2022): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa černého (*Ciconia nigra*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Navrátilová, J. (2009): Polymorfní DNA mikrosatelity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Nedvědová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Nevimová, K. (2012): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu brodiví u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Novosadová, E. (2012): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu veslonoží a plameňáci u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Obručová, E. (2009): Polymorfní DNA mikrosatelity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294–307.
- Pearson, C. E., Nichol-Edamura, K., Cleary, J. D. (2005): Repeat instability: Mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews Genetics* 6, 729–742.
- Pechová, A. (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Preston, E. L. (2005): Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Disertační práce. Depon in: University of North Texas Digital Library.

- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature* 526, 569–573.
- 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.
- Reddy, S., Kimball, R. T., Pandey, A., Hosner, P. A., Braun, M. J., Hackett, S. J., Han, K-L., Harshman, J., Huddleston, C. J., Kingston, S., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Witt, C. C., Yuri, T., Braun, E. L. (2017): Why do phylogenomic data sets yield conflicting trees? Data type influences the avian tree of life more than taxon sampling. *Systematic Biology* 66, 857–879.
- Richard, G. F., Pâques, F. (2000). Mini- and microsatellite expansions: The recombination connection. *EMBO Reports* 11, 122–126.
- Riordan, J., Gardner, M. G., Fitch, A. J., Johnston, G. R. (2012): Isolation, via 454 sequencing, and characterisation of microsatellites for *Phalacrocorax fuscescens*, the blackfaced cormorant (Aves: Phalacrocoracidae). *Australian Journal of Zoology* 60, 340–342.
- Rolfsmeier, M. L., Lahue, R. S. (2000): Stabilizing effects of interruptions on trinucleotide repeat expansions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology* 20, 173–180.
- Rose, O., Falush, D. (1998): A threshold size for microsatellite expansion. *Molecular Biology and Evolution* 15, 613–615.
- Rousset, F. (2008): GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103–106.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. In: Wang, H., Lou, X., Qiongqiong, Z., Huang, Y., Zhou, L., Zhang, B. (2011): Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for the oriental white stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science* 28, 606–608.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001): Commonly used techniques in molecular cloning, appendix 8. *Molecular Cloning*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory

- Press. Cold Spring Harbor, New York. In: Ferrie, G. M., Cohen, O. R., Schutz, P., Leighty, K. A., Plasse, C., Bettinger, T. L., Hoffman, E. A. (2013): Identifying parentage using molecular markers: Improving accuracy of studbook records for a captive flock of marabou storks (*Leptoptilos crumeniferus*). *Zoo Biology* 32, 556–564.
- Sangster, G., Mayr, G. (2021): Feraequornithes: a name for the clade formed by Procellariiformes, Sphenisciformes, Ciconiiformes, Suliformes and Pelecaniformes (Aves). *Vertebrate Zoology* 71, 49–53.
- Seligmann, I. C. A., Furo, I. O., dos Santos, M. S., Tagliarini M. M., Araujo, C. C. D., O'Brien, P. C. M., Ferguson-Smith, M. A., de Olivera, E. H. C. (2019): Comparative chromosome painting in two Brazilian stork species with different diploid numbers. *Cytogenetic and Genome Research* 159, 32–38.
- Sharma, B. B., Mustafa, M., Sharma, T., Banerjee, B. D., Urfi, A. J. (2014): Cross-species amplification of microsatellite markers in *Mycteria leucocephala* Pennant 1769: Molted feathers as successful DNA source. *Indian Journal of Experimental Biology* 52, 1011–1016.
- Shephard, J. M., Galbusera, P., Hellemans, B., Jusic, A., Akhandaf, Y. (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European white stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics* 10, 1525–1528.
- Schlosser, J. A., Dubach, J. M., Garner, T. W. J., Araya, B., Bernal, M., Simeone, A., Wallace, R. S. (2009): Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetics* 10, 839–849.
- Schlosser, J. A., Garner, T. W. J., Dubach, J. M., McElligott, A. G. (2003): Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes* 3, 62–64.
- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365–371.
- Schlötterer, C., Tautz, D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20, 211–215.

- Sia, E. A., Jinks-Robertson, S., Petes, T. D. (1997): Genetic control of microsatellite instability. *Mutation Research* 383, 61–70.
- 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). *Evolution* 52, 884–894.
- Srivastava, S., Avvaru, A. K., Sowpati, D. T., Mishra R. K. (2019): Patterns of microsatellite distribution eukaryotic genomes. *BMC Genomics* 20, 153.
- Strand, M., Prolla, T. A., Liskay, R. M., Petes, T. D. (1993): Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 365, 274–276.
- Streisinger, G., Owen, J. (1985): Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. *Genetics* 109, 633–659.
- 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.
- Šuláková, M. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Šuláková, M. (2019): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Takagi, N., Sasaki, M. (1974): A phylogenetic study of bird karyotypes. *Chromosoma* 46, 91–120.
- Taylor, J. S., Durkin, J. M., Breden, F. (1999): The death of a microsatellite: A phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Molecular Biology and Evolution* 16, 567–572.

- Taylor, S. A., Morris-Pocock, J. A., Sun, Z., Friesen, V. L. (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151, 525–528.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004) Characterization of microsatellite loci in white-chinned petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-species amplification in six other Procellariiform species. *Molecular Ecology Notes* 4, 33–35.
- Todesco, M., Pascual, M. A., Owens, G. L., Ostevik, K. L., Moyers, B. T., Hübner, S., Heredia, S. M., Hahn, M. A., Caseys, C., Bock, D. G., Rieseberg (2016): Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications* 9, 892–908.
- Tomasulo-Seccomandi, A. M., Schable N. A., Bryan JR., A. L., Brisbin JR., I. L., Lama, S. N. D., Glenn, T. C. (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3, 563–566.
- Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10, 967–981.
- Turjeman, S. F., Centeno–Cuadros, A., Nathan, R. (2016): Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite markers for the white stork, *Ciconia ciconia*: applications in individual–based and population genetics. *Animal Biodiversity and Conservation* 39, 11–16.
- Urfi, A. J. (2011): *The Painted Stork: Ecology and Conservation*. Springer Science & Business Media, Berlin. In: Kaminsin, D., Warrit, N., Sankhom, R., Piamsanga, K., Sanannu, S., Baicharoen, S., Wiwegweaw, A. (2023): Detecting introgressive hybridization to maintain genetic integrity in endangered large waterbird: a case study in milky stork. *Nature - Scientific Reports* 13, 8892.
- Van Den Bussche, R. A., Harmon, S. A., Baker, R. J., Bryan JR., A. L., Rodgers JR., A., Harris, M. J., Brisbin JR., I. (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the wood stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 116, 1083–1092.
- Verešová, D. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) a u plameňáka růžového (*Phoenicopterus*

- roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Wang, H., Lou, X., Qiongqiong, Z., Huang, Y., Zhou, L., Zhang, B. (2011): Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for the oriental white stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science* 28, 606–608.
- Wayne, R. K., Shafer, H. B. (2016): Hybridization and endangered species protection in the molecular era. *Molecular Ecology* 25, 2680–2689.
- Webster, M. T., Smith, N. G., Ellegren, H. (2002): Microsatellite evolution inferred from human–chimpanzee genomic sequence alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8748–8753.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources* 3, 581–584.
- Wetlands International (2012): Waterbird population estimates: Summary Report. [online] [navštíveno 2. 2. 2024] Dostupné z <https://www.wetlands.org/>
- Wilder, J., Hollocher, H. (2001): Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Molecular Biology and Evolution* 18, 384–392.
- Winkler, D. W., Billerman, S. M., Lovette, I. J. (2020): Storks (Ciconiidae). [online] [navštíveno 28. 1. 2024] Dostupné z <https://birdsoftheworld.org/>
- Zane, L., Bargelloni, L., Paternello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1–16.
- Zhang, G., Li, C., Li, Q., Li, B., Larkin, D. M., Lee, C., Storz, J. F., Antunes, A., Greenwold, M. J., Meredith, R. W., *et al.* (2014) Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. *Science* 346, 1311–1320.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7, 203–214.
- Zhu, Y., Strassmann, J. E., Queller, D. C. (2000): Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genetics Research* 76, 227–236.
- Zlochová, A. (2019): Amplifikace vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.



## 9 Přílohy

**Příloha č. 1:** Charakteristika 47 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 10 nepříbuzných jedinců čápa bílého. Výstup z programu Cervus 3.0.7.

Lokus	$N_A$	$H_{obs}$	$H_{exp}$	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	$F_{null}$
<b>11H7</b>	2	0.200	0.189	0.164	0.984	0.918	0.856	0.689	0.832	ND	-0.0462
<b>B102</b>	2	0.200	0.189	0.164	0.984	0.918	0.856	0.689	0.832	ND	-0.0462
<b>Bb21</b>	2	0.100	0.100	0.090	0.995	0.955	0.916	0.824	0.908	ND	-0.0164
<b>Calex-01</b>	2	0.300	0.395	0.305	0.930	0.848	0.761	0.461	0.678	ND	0.1111
<b>CAM-05</b>	12	1.000	0.953	0.897	0.325	0.193	0.060	0.017	0.302	ND	-0.0505
<b>CAM-11</b>	4	0.500	0.658	0.578	0.785	0.616	0.436	0.188	0.484	NS	0.1300
<b>CAM-24</b>	2	0.200	0.442	0.332	0.912	0.834	0.745	0.425	0.646	ND	0.3548
<b>Cc10</b>	2	0.100	0.395	0.305	0.930	0.848	0.761	0.461	0.678	ND	0.5785
<b>Cc42</b>	6	0.800	0.832	0.759	0.589	0.410	0.228	0.075	0.374	ND	-0.0019
<b>Cc72</b>	3	0.300	0.637	0.527	0.817	0.682	0.535	0.234	0.506	NS	0.3668
<b>De3</b>	4	0.600	0.711	0.619	0.748	0.583	0.409	0.162	0.453	NS	0.0773
<b>Ech007</b>	2	0.200	0.189	0.164	0.984	0.918	0.856	0.689	0.832	ND	-0.0462
<b>Ech011</b>	3	0.600	0.568	0.466	0.854	0.727	0.588	0.285	0.551	NS	-0.0250
<b>Ech030</b>	2	0.200	0.189	0.164	0.984	0.918	0.856	0.689	0.832	ND	-0.0462
<b>Ech036</b>	5	0.600	0.511	0.460	0.869	0.705	0.525	0.290	0.580	ND	-0.1527
<b>Ee18</b>	5	0.600	0.816	0.739	0.621	0.442	0.261	0.087	0.384	ND	0.1248
<b>Ee20</b>	5	0.600	0.774	0.694	0.673	0.495	0.310	0.111	0.410	NS	0.1022
<b>Ee43</b>	5	0.500	0.568	0.508	0.837	0.669	0.483	0.244	0.541	NS	0.0025
<b>Em5</b>	3	0.500	0.484	0.410	0.894	0.763	0.624	0.341	0.605	ND	-0.0144
<b>Emm8</b>	2	0.500	0.479	0.351	0.896	0.824	0.733	0.401	0.623	NS	-0.0471
<b>G215</b>	2	0.400	0.337	0.269	0.949	0.866	0.783	0.514	0.718	ND	-0.1097
<b>Man27</b>	3	0.500	0.616	0.495	0.829	0.710	0.571	0.262	0.523	NS	0.0830
<b>Ole10</b>	3	0.300	0.358	0.314	0.942	0.823	0.701	0.461	0.695	ND	0.1335
<b>Ole21</b>	2	0.200	0.442	0.332	0.912	0.834	0.745	0.425	0.646	ND	0.3548

Příloha č. 1: Pokračování.

<b>Lokus</b>	<b>N<sub>A</sub></b>	<b>H<sub>obs</sub></b>	<b>H<sub>exp</sub></b>	<b>PIC</b>	<b>NE-1P</b>	<b>NE-2P</b>	<b>NE-PP</b>	<b>NE-I</b>	<b>NE-SI</b>	<b>HW</b>	<b>F<sub>null</sub></b>
<b>Omn2</b>	2	0.500	0.395	0.305	0.930	0.848	0.761	0.461	0.678	ND	-0.1423
<b>Omn8</b>	7	0.800	0.774	0.707	0.649	0.464	0.263	0.098	0.407	NS	-0.0368
<b>Omn25</b>	3	0.600	0.637	0.527	0.817	0.682	0.535	0.234	0.506	NS	0.0172
<b>Pacbel_07265</b>	2	0.400	0.337	0.269	0.949	0.866	0.783	0.514	0.718	ND	-0.1097
<b>Pacbel_16989</b>	2	0.400	0.505	0.365	0.885	0.818	0.725	0.386	0.606	NS	0.0909
<b>Pacbel_17944</b>	2	0.200	0.189	0.164	0.984	0.918	0.856	0.689	0.832	ND	-0.0462
<b>Pacbel_19907</b>	2	0.600	0.526	0.375	0.875	0.813	0.719	0.375	0.594	NS	-0.0909
<b>Paequ8</b>	2	0.500	0.395	0.305	0.930	0.848	0.761	0.461	0.678	ND	-0.1423
<b>Patbel2</b>	12	1.000	0.921	0.864	0.395	0.245	0.088	0.027	0.319	ND	-0.0718
<b>PcB109</b>	2	0.200	0.337	0.269	0.949	0.866	0.783	0.514	0.718	ND	0.2308
<b>PcD103</b>	3	0.500	0.416	0.347	0.922	0.808	0.690	0.414	0.656	ND	-0.1349
<b>Pf36</b>	6	0.500	0.684	0.620	0.744	0.559	0.355	0.153	0.463	NS	0.1487
<b>Ptero02</b>	4	0.900	0.721	0.627	0.740	0.576	0.404	0.157	0.447	NS	-0.1516
<b>Ptero09</b>	7	0.700	0.679	0.612	0.747	0.566	0.363	0.159	0.467	NS	-0.0332
<b>PuffG2C</b>	2	0.100	0.268	0.222	0.967	0.889	0.814	0.588	0.769	ND	0.4348
<b>Pygantarc29</b>	2	0.500	0.395	0.305	0.930	0.848	0.761	0.461	0.678	ND	-0.1423
<b>RBG18M</b>	2	0.100	0.100	0.090	0.995	0.955	0.916	0.824	0.908	ND	-0.0164
<b>Sh2Ca12</b>	2	0.400	0.337	0.269	0.949	0.866	0.783	0.514	0.718	ND	-0.1097
<b>Sh2Ca58</b>	3	0.300	0.426	0.368	0.918	0.789	0.655	0.391	0.645	ND	0.1335
<b>STAL18</b>	3	0.400	0.637	0.527	0.817	0.682	0.535	0.234	0.506	NS	0.1875
<b>TG01-077</b>	3	0.600	0.695	0.586	0.782	0.635	0.486	0.189	0.467	NS	0.0496
<b>TG01-148</b>	3	0.500	0.426	0.368	0.918	0.789	0.655	0.391	0.645	ND	-0.1312
<b>TG11-011</b>	3	0.300	0.468	0.381	0.901	0.789	0.668	0.372	0.621	ND	0.2339

Legenda:

$N_A$	počet nalezených alel na lokusu
$H_{obs}$	pozorovaná heterozygotnost
$H_{exp}$	očekávaná heterozygotnost
PIC	polymorfni informační obsah
NE-1P	pravděpodobnost chybného přiřazení prvního rodiče k mláděti v případě, že není znám ani jeden z rodičů
NE-2P	pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče k mláděti v případě, že je znám první z rodičů
NE-PP	pravděpodobnost chybného přiřazení rodičovského páru k mláděti
NE-I	pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfni lokusů u dvou náhodně vybraných nepříbuzných jedinců
NE-SI	pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfni lokusů u dvou příbuzných mláďat
HW	soulad/odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy
NS	lokus je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
ND	lokus nelze vyhodnotit, zda je nebo není v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
$F_{null}$	frekvence výskytu nulových alel

Number of individuals:	10
Number of loci:	47
Mean number of alleles per locus:	3.447
Mean proportion of loci typed:	1.0000
Mean expected heterozygosity:	0.4915
Mean polymorphic information content (PIC)	0.4165
Combined non-exclusion probability (first parent):	$1,8465 \cdot 10^{-4}$
Combined non-exclusion probability (second parent):	$8,0000 \cdot 10^{-8}$
Combined non-exclusion probability (parent pair):	$8,4580 \cdot 10^{-13}$
Combined non-exclusion probability (identity):	$1,6540 \cdot 10^{-25}$
Combined non-exclusion probability (sib identity):	$1,1700 \cdot 10^{-11}$

**Příloha č. 2:** Mikrosateltní lokusy od zástupců z řádu trubkonosí a tučňáci a od konzervovaných ptačích mikrosatelitů, které byly polymorfni alespoň u jednoho ze tří druhů z rodu *Ciconia*. Jedná se o čápa bílého (n=23) (Macková, 2023; Krňávková, 2023), černého (n=24) (Musilová, osobní sdělení) a simbila (n=10) (tato práce).

Lokus	Čáp bílý	Čáp černý	Čáp simbil	Lokus	Čáp bílý	Čáp černý	Čáp simbil	Lokus	Čáp bílý	Čáp simbil	Lokus	Čáp bílý	Čáp simbil
11H7	M	6	2	Pacbel_07265	5	M	2	CAM-05	2	12	TG01-148	M	3
10C5	M	5	M	Pacbel_16989	M	2	2	CAM-11	2	4	TG03-002	2	M
11F3	M	2	M	Pacbel_17944	M	M	2	CAM-15	2	M	TG04-061	M	NA
Bb21	M	M	2	Pacbel_19907	M	2	2	CAM-24	2	2	TG08-024	2	M
Bb22	2	M	M	Paequ8	M	M	2	Ech007	M	2	TG11-011	M	3
Bb23	2	M	M	Paequ10	2	2	M	Ech011	M	3	TG13-017	2	M
Cd3	M	2	M	Parm02	3	M	M	Ech030	4	2			
D6	M	2	M	Parm03	M	2	M	Ech036	M	5			
Dc21	M	2	M	Parm05	2	M	M	Em5	M	3			
De3	M	M	4	Patbel2	M	M	12	Em8	3	M			
De7	2	M	M	Pc A107	2	M	M	Em14	2	M			
Oc28B	2	M	M	Pc B109	M	M	2	Em23	M	NA			
Ole10	M	M	3	Pc D103	4	M	3	Emm8	2	2			
Ole19	M	M	NA	Ptero02	4	M	4	Man27	2	3			
Ole21	M	M	2	Ptero04	3	M	M	Pygantarc16	2	M			
Ole26	M	2	M	Ptero09	4	M	7	Pygantarc29	M	2			
Omn2	M	M	2	Puff G2C	4	M	2	Sh2Ca12	4	2			
Omn8	6	3	7	Puff G2F	2	M	M	Sh2Ca58	M	3			
Omn23	2	M	M	STAL8	M	8	M	TG01-077	M	3			
Omn25	M	2	3	STAL18	M	M	3	TG01-124	2	M			

Legenda: M - monomorfni lokus; číslo - počet alel na lokus; NA - u lokusu se nepodařil určit počet alel; červená - lokus je polymorfni u všech 3 druhů; modrá - lokus je polymorfni u čápa bílého a simbila; zelená - lokus je polymorfni u čápa bílého a černého; žlutá - lokus je polymorfni u čápa černého a simbila