

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Klára Košatová

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci  
a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa simbila**

***(Ciconia abdimii)***

**Bakalářská práce**

**Klára Košatová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2020**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Klára KOŠATOVÁ  
Osobní číslo: R17788  
Studijní program: B1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa simbila (*Ciconia abdimii*).  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce. 2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů. 3. PCR amplifikace DNA čápa simbila s využitím cross-species primerů pro ptáky z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.  
Rozsah práce 40 stran

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

### Seznam doporučené literatury:

1)Prum, R.O. et al. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569-573. 2)Dawson, D.A. et al. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176. 3)Dawson, D.A. et al. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475-494. 4)Ahmed, S. et al. (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1530-1535. 5)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.

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.  
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 12. října 2018  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2020

V Olomouci dne 8. listopadu 2018

L.S.

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLIE A GENETIKY  
Šteklův nábřeží 58, Olomouc – Lázeň  
tel.: 52 579 54 004

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

22. 3. 19

## **Bibliografické údaje**

**Jméno a příjmení autora:** Klára Košatová

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

**Typ práce:** Bakalářská práce

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

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

**Rok obhajoby práce:** 2020

### **Souhrn:**

V této bakalářské práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa simbila (*Ciconia abdimii*).

V teoretické části jsem se věnovala vývoji a změnám taxonomického zařazení čápa simbila do systému ptáků, dále jsem popsala řád čápi (Ciconiiformes), do kterého je v současnosti řazena jediná čeleď čápovití (Ciconiidae). Popsala jsem mikrosatelity, jako molekulové markery a zaměřila jsem se na charakteristiku mikrosatelitů navržených pro řád tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů.

V praktické části jsem provedla *cross-species* PCR amplifikaci celkem 173 mikrosatelitů na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila, s cílem nalezení polymorfních mikrosatelitních lokusů. 113 párů primerů bylo původně navrženo pro amplifikaci mikrosatelitů od zástupců z řádu tučňáci a 60 párů primerů pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů, z toho 36 párů primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Získala jsem celkem 21 polymorfních mikrosatelitních lokusů, za použití 14 párů primerů původně navržených pro pět druhů tučňáků, čtyři páry primerů pro EST ptačí mikrosatelity a tři páry primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity. Nalezené polymorfní mikrosatelity měly od dvou do devíti alel na lokus.

**Klíčová slova:** čáp simbil, *Ciconia abdimii*, tučňák, *cross-species* PCR amplifikace, DNA, mikrosatelit

**Počet stran:** 63

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** Český

**Bibliographical identification****Author's first name and surname:** Klára Kořatová**Title:** *Cross-species* amplification of microsatellites from Sphenisciformes and conserved avian microsatellites in Abdim's Stork (*Ciconia abdimii*)**Type of thesis:** Bachelor thesis**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc**Supervisor:** RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.**The year of presentation:** 2020**Summary:**

In this bachelor thesis I focused on searching for polymorphic microsatellite loci for Abdim's Stork (*Ciconia abdimii*).

In the theoretical part I concentrated on the development and changes of the Abdim's Stork classification within the current system of birds. Further I characterized the order Ciconiiformes which currently contains only one family Ciconiidae. I described microsatellites and their role as molecular markers with the emphasis on characteristics of pairs of primers designed for the amplification of microsatellites of order penguins and universal avian microsatellites.

In the experimental part I did cross-species PCR amplifications of totally 173 microsatellites on the genomic DNA of 6 unrelated individuals of Abdim's Stork with the goal of determining polymorphic microsatellite loci. Originally 113 pairs of primers were constructed for the amplification of microsatellites of penguin species and 60 pairs of primers for the amplification of universal avian microsatellites, of which 36 primer pairs were designed for amplification of EST avian microsatellites and 24 pairs of primers for amplification of conserved avian microsatellites. I determined 21 polymorphic microsatellite loci in total by utilization of 14 pairs of primers originally designed for 5 penguin species, 4 pairs of primers for EST bird microsatellites and 3 pairs of primers for conserved bird microsatellites. The number of alleles ranged from 2 to 9 per locus.

**Keywords:** Abdim's Stork, *Ciconia abdimii*, penguin, cross-species PCR amplification, DNA, microsatellite**Number of pages:** 63**Number of appendices:** 0**Language:** Czech

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

V Olomouci dne: .....

.....

Klára Košatová

Ráda bych srdečně poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Petru Nádvořníkovi, Ph.D. za veškerou ochotu, věnovaný čas, poskytnuté materiály a odborné vedení po celou dobu vypracovávání této bakalářské práce. Dále chci poděkovat celému kolektivu Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za cenné rady a příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu během celého studia.

## Obsah

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>Úvod</b> .....  | 1  |
| <b>2</b> | <b>Cíle práce</b> .....                                    | 2  |
| <b>3</b> | <b>Literární přehled</b> .....                             | 3  |
| 3.1      | Taxonomické zařazení čápů .....                            | 3  |
| 3.2      | Řád čápi .....   | 4  |
| 3.3      | Čáp simbil .....   | 6  |
| 3.4      | Mikrosatelity .....  | 7  |
| 3.5      | Mikrosatelity od zástupců z řádu tučňáci .....             | 8  |
| 3.5.1    | Rod <i>Eudypetes</i> .....                                 | 9  |
| 3.5.2    | Rod <i>Eudypsula</i> .....                                 | 10 |
| 3.5.3    | Rod <i>Megadyptes</i> .....                                | 12 |
| 3.5.4    | Rod <i>Pygoscelis</i> .....                                | 12 |
| 3.5.5    | Rod <i>Spheniscus</i> .....                                | 15 |
| 3.6      | Univerzální ptačí mikrosatelity .....                      | 17 |
| 3.6.1    | EST ptačí mikrosatelity .....                              | 17 |
| 3.6.2    | Konzervované ptačí mikrosatelity .....                     | 18 |
| <b>4</b> | <b>Materiál a metody</b> .....                             | 20 |
| 4.1      | Biologický materiál.....                                   | 20 |
| 4.2      | Použité chemikálie .....                                   | 20 |
| 4.3      | Použité roztoky.....                                       | 21 |
| 4.4      | Laboratorní přístroje.....                                 | 22 |
| 4.5      | PCR amplifikace mikrosatelitů .....                        | 23 |
| 4.6      | Elektroforetická separace a vizualizace PCR produktů ..... | 26 |
| <b>5</b> | <b>Výsledky</b> .....                                      | 29 |
| <b>6</b> | <b>Diskuse</b> .....                                       | 36 |
| <b>7</b> | <b>Závěr</b> .....   | 47 |
| <b>8</b> | <b>Literatura</b> .....                                    | 48 |



## Seznam symbolů a zkratek

|                |  |
|----------------|--|
| A              | adenin   |
| bp             | pár bází   |
| C              | cytosin  |
| CAM            | konzervovaný ptačí mikrosatelit (Conserved Avian Microsatellite) |
| dNTPs          | deoxyribonukleosid trifosfáty                                    |
| EST            | exprimované sekvenční úseky                                      |
| G              | guanin   |
| min            | minuta   |
| PCR            | polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)         |
| SSRs           | repetice jednoduchých sekvencí (Simple Sequence Repeats)         |
| STRs           | krátké tandemové repetice (Short Tandem Repeats)                 |
| T              | thymin   |
| T <sub>a</sub> | teplota <i>annealingu</i>  |

## Seznam obrázků a grafů

|  |    |
|--|----|
| <b>Obrázek č. 1:</b> Znázornění rodů čáp ( <i>Ciconia</i> ) a tučňák ( <i>Spheniscus</i> ) patřících dle Prum <i>et al.</i> (2015) do kladu Aequorlitorornithes..... | 4  |
| <b>Obrázek č. 2:</b> Fylogenetické vztahy druhů rodu čáp ( <i>Ciconia</i> ) podle Slikas (1997). ....  | 5  |
| <b>Obrázek č. 3:</b> Čáp simbil v Zoo Praha (Copyright © Miroslav Heráň).....  | 7  |
| <b>Obrázek č. 4:</b> Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Ech011 .....   | 34 |
| <b>Obrázek č. 5:</b> Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Ech036.....  | 34 |
| <b>Obrázek č. 6:</b> Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Sh2Ca12. ....  | 34 |
| <b>Obrázek č. 7:</b> Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Sh2Ca58. ....  | 35 |
| <b>Obrázek č. 8:</b> Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu CAM-24.....  | 35 |
| <b>Graf č. 1:</b> Rozdělení 21 polymorfních mikrosatelitních lokusů nalezených u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila podle zdroje.....                           | 31 |

## Seznam tabulek

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabulka č. 1:</b> Rody a druhy patřící do řádu tučňáci (Sphenisciformes) podle del Hoyo et al. (2018) s počty mikrosatelitů (MS) pro jednotlivé druhy a s literárním zdrojem. ....   | 8  |
| <b>Tabulka č. 2:</b> Přehled mikrosatelitových lokusů z řádu tučňáci testovaných na polymorfismus u čápa simbila. ....  | 23 |
| <b>Tabulka č. 3:</b> Přehled univerzálních ptačích mikrosatelitů testovaných na polymorfismus u čápa simbila. ....  | 24 |
| <b>Tabulka č. 4:</b> Složení PCR reakční směsi pro 6 vzorků. ....   | 25 |
| <b>Tabulka č. 5:</b> Teplotní a časový profil PCR reakce. ....  | 26 |
| <b>Tabulka č. 6:</b> Charakteristika 21 polymorfních mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. ....  | 30 |
| <b>Tabulka č. 7:</b> Genotypy 21 polymorfních mikrosatelitních lokusů získaných amplifikací u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. ....   | 33 |
| <b>Tabulka č. 8:</b> Porovnání počtu získaných alel u čtyř EST ptačích mikrosatelitů polymorfních u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila s počty alel dalších 22 druhů ptáků (Dawson <i>et al.</i> , 2010). ....   | 39 |
| <b>Tabulka č. 9:</b> Porovnání počtu získaných alel u tří konzervovaných ptačích mikrosatelitů polymorfních u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila s počty alel dalších 12 druhů ptáků (Dawson <i>et al.</i> , 2013). ....   | 41 |
| <b>Tabulka č. 10:</b> Souhrn polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů, které byly získány <i>cross-species</i> PCR amplifikací u čápa simbila a jejich porovnání s výsledky dalších osmi druhů ptáků z kladu Aequorlithornithes, testovaných se stejnými mikrosatelity. .... | 45 |

## 1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké, zpravidla 1–6 bp dlouhé, tandemově se opakující sekvence DNA. Vyskytují se jak v prokaryotických, tak v eukaryotických genomech, v protein kódujících i protein nekódujících oblastech DNA. Pro svou mutační rychlost (řádově  $10^{-2}$  až  $10^{-4}$ /lokus/generace) jsou mikrosatelity využívány jako genetické markery. Lze je využít při studiu fylogenetické příbuznosti jedinců, paternity, velikosti a struktury populací a v taxonomii.

V Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci byly již na vzorcích nepříbuzných jedinců čápa simbila (*Ciconia abdimii*) testovány mikrosatelity od zástupců z kladu Aequorlitorornithes z řádů brodiví, potápky, potáplice, dlouhokřídlí, tučňáci, vrubozobí, veslonozí a plameňáci. Tato bakalářská práce je tedy v návaznosti s předchozími pracemi, zabývajícími se hledáním polymorfních mikrosatelitů u čápa simbila.

Cílem mé bakalářské práce je nalezení polymorfních mikrosatelitních lokusů u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila metodou *cross-species* PCR amplifikace. Testováno bude celkem 173 párů primerů, z toho 113 párů primerů původně navržených pro zástupce z řádu tučňáci a 60 párů primerů pro univerzální ptačí mikrosatelity (36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity a 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity).

## 2 Cíle práce

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

### 3 Literární přehled

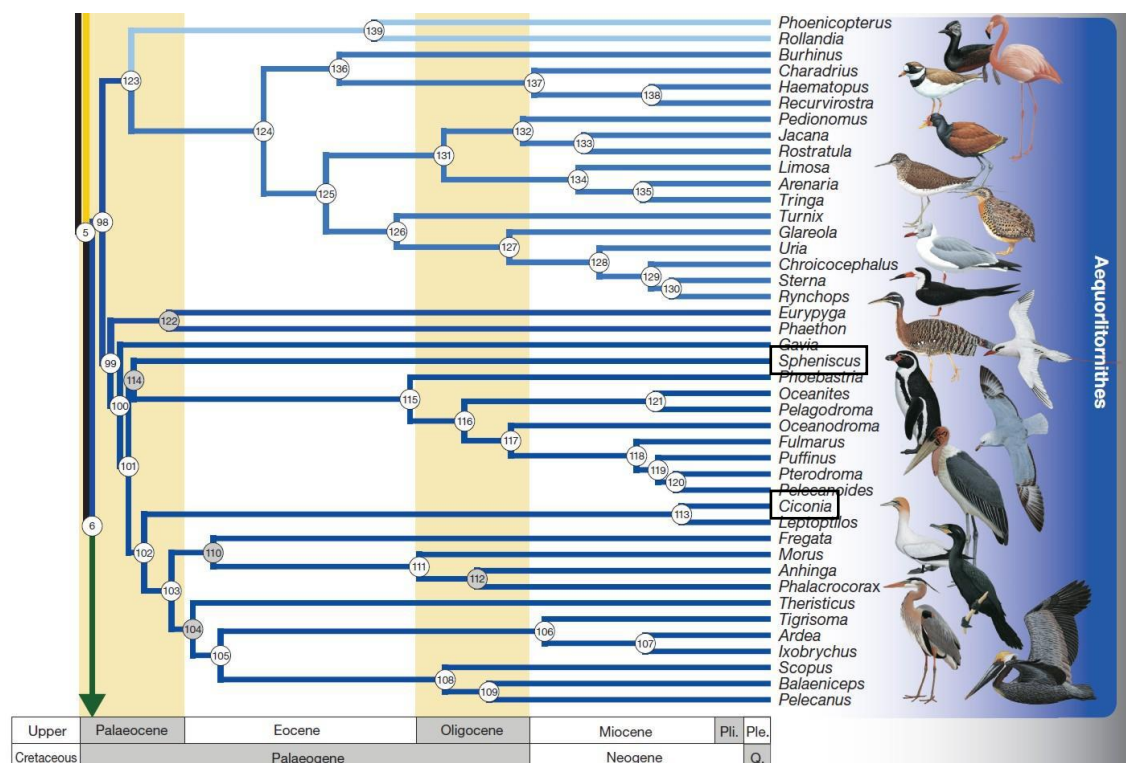
#### 3.1 Taxonomické zařazení čápů

Fylogeneze létavých ptáků (Neognathae) je studována už více než jedno století, důvodem častého nesouladu mezi morfologickým a molekulárním hodnocením fylogeneze a systematického členění jsou dlouhodobé a složité evoluční procesy. V současnosti jsou za bazální skupinu neognátních ptáku považováni hrabaví a vrubozobí (Galloanseres), ostatní neognátní ptáci jsou řazeni do sesterské skupiny Neoaves, která pravděpodobně prošla velice náhle nejméně osmi speciálními událostmi a je tak největším problémem fylogeneze ptáků (Kuramoto *et al.*, 2015, Gaisler *et Zima*, 2018).

Při DNA-DNA hybridizačních studiích byla čeleď čápoovití (Ciconiidae) řazena společně s čeleděmi volavkovití (Ardeidae), kladivoušovití (Scopidae), plameňákovití (Phoenicopteridae), ibisovití (Threskiornithidae), pelikánovití (Pelecanidae), fregatkovití (Fregatidae), tučňákovití (Spheniscidae), potáplicovití (Gaviidae) a buňňákovití (Procellariidae) do parvřádu Ciconiida, který byl součástí nadřádu Ciconii. Nadřád Ciconii patřil společně s nadřádem Charadrii do řádu brodiví (Ciconiiformes) (Sibley *et al.*, 1988).

Dřívější rozdělení třídy ptáci (Aves) na infratřídy Eoaves a Neoaves bylo Hackettem *et al.* (2008) na základě studií 19 jaderných lokusů u 169 druhů ptáků změněno. Dělí třídu ptáci na běžce (Paleognathae) a letce (Neognathae). Letci jsou dále děleni do kladů Galloanserae a Neoaves. Čápi (*Ciconia*) jsou v tomto pojetí systému opět řazeni do řádu brodiví (Ciconiiformes), společně s volavkami (*Ardea*), volavčíkem (*Cochlearius*), ibisem (*Eudocimus*), člunozubcem (*Balaniceps*) a kladivoušem (*Scopus*), došlo však k přeskupení tohoto řádu (Hackett *et al.*, 2008).

Prum *et al.* (2015) při analýze sekvenačních dat 198 druhů ptáků nepotvrdili původní rozdělení brodivých a veslonohých. Vytvořili velkou fylogenetickou linii Neoaves zvanou Aequornithes, kterou v současnosti tvoří, s výjimkou vrubozobých, ptáci vázaní na vodní prostředí. Patří zde potáplice, tučňáci, trubkonosí, čápi, pelikáni, brodiví a veslonožci. Někdy jsou do této skupiny řazeny i potápky a plameňáci, potom se celá skupina nazývá Aequorlithornithes. Do řádu Ciconiformes řadí autoři pouze čeleď čápoovití (Ciconidae). Ostatní čeledi dříve řazené do tohoto řádu byly přesunuty k rodu pelikán (*Pelecanus*) do řádu Pelecaniformes, který rozdělili na dvě sesterské skupiny (Obrázek č. 1).



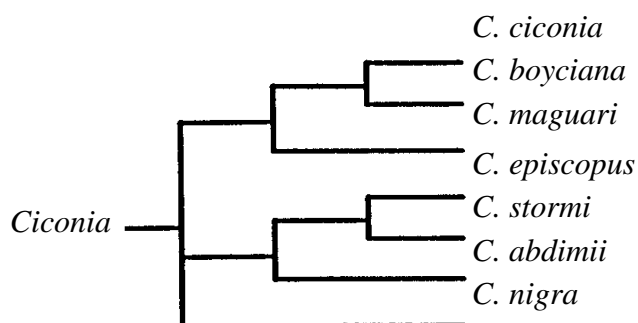
**Obrázek č. 1:** Znárodnění rodů čáp (*Ciconia*) a tučňák (*Spheniscus*) patřících dle Prum *et al.* (2015) do kladu Aequorlornithes.

Gaisler *et Zima* (2018) uvádějí v souladu se studií Prum *et al.* (2015), že bylo rozdělení tradičního řádu brodivých (Ciconiformes) a veslonohých (Pelecaniformes) zpochybněno blízkým vztahem mezi čeleděmi pelikánovití (Pelecanidae), kladivoušovití (Scopidae), člunozobcovití (Balaenicipitidae), volavkovití (Ardeidae) a ibisovití (Threskiornithidae). Volavkovití (Ardeidae), ibisovití (Threskiornithidae) a čápoovití (Ciconiidae) jsou v některých studiích oddělováni do zvláštních řádů Ardeiformes a Ciconiiformes, přesné větvení fylogenetického stromu brodivých ale stále není jasné (Gaisler *et Zima*, 2018).

### 3.2 Řád čápi

Řád čápi (Ciconiiformes) byl v původním fylogenetickém pojetí řádem brodiví, v současné době je považován za monofyletický a zahrnuje jedinou čeleď čápoovití (Ciconiidae) (Šťastný *et Hudec*, 2016). Do čeledi čápoovití je řazeno necelých 20 druhů ze šesti rodů: nesyt (*Mycteria*), zejzob (*Anastomus*), jabiru (*Jabiru*), marabu (*Leptoptilos*) a rody *Ciconia* a *Ephippiorhynchus*, pro oba z nich je používáno české rodové jméno čáp (Gill *et al.*, 2020). Rod čáp (*Ciconia*) je tvořen sedmi druhy, jejichž fylogenetické vztahy jsou znázorněny na obrázku č. 2 (Slikas, 1997). Tento rod je rozšířen

po celém světě, přičemž v České republice hnízdí pouze dva druhy - čáp bílý (*Ciconia ciconia*) a čáp černý (*C. nigra*) (Gaisler *et* Zima, 2018).



**Obrázek č. 2:** Fylogenetické vztahy druhů rodu čáp (*Ciconia*) podle Slikas (1997).

Čápi jsou velcí až obrovští ptáci s výškou 70–150 cm a hmotností 2–9 kg, patří k vytrvalým letcům s širokými křídly s rozpětím až 320 cm (Gosler, 1994). Vzhledem jsou podobní volavkám (Šťastný *et al.*, 1998). Mají dlouhý klínový zobák a dlouhý krk. Protáhlé brodivé nohy, hlavně v oblasti běháku a bérce, jim umožňují udržet opeření v suchu, zatímco natahují hlavu a krk k vodě (Burnie, 2002, Šťastný *et* Hudec, 2016). Vole jim obvykle chybí, žaludek je třídlý a samci mají rudimentální penis (Gaiser *et* Zima, 2018).

Čápi mají tuhé přiléhavé obrysové peří, bez výrazného sexuálního dimorfismu, jejich kostra je lehká a pneumatizovaná (Gosler, 1994). Většinou se vyskytují v okolí vnitrozemských vod, v otevřené i lesní krajině. Hnízda si stavějí z větví a klacků na stromech a v rákosinách, žijí jednotlivě nebo v koloniích. Oba partneři vysedávají 30–50 dnů na 3–5 vejcích. Mláďata jsou nidikolní a vzlétají za 50–126 dnů, starají se o ně oba rodiče, kteří žijí v monogamii (Gosler, 1994, Gaisler *et* Zima, 2018).

V případě ohrožení není pro čápy typický běh, jestliže prchají, raději vzlétnou, umí výborně plachtit. Jejich nohy i krk jsou za letu natažené. Mají dlouhé a ohebné prsty, s nízko posazeným palcem, které jim slouží k udržení na větvích stromů (Šťastný *et* Hudec, 2016). Jejich hlasové ústrojí je zakrnělé, proto se akusticky projevují pouze klapáním zobáku (Šťastný *et al.*, 1998).

Čápi jsou přizpůsobeni k získávání potravy z vody nebo bažinatých biotopů. Loví hlavně živočišnou potravu, kterou sbírají při chůzi v mělké vodě nebo na suchu, jen výjimečně jsou mrchožraví (Šťastný *et al.*, 1998, Gaisler *et* Zima 2018). Jejich potravou jsou především obojživelníci, ryby, drobní savci, hmyz a červi (Gaisler *et* Zima, 2007). Řád čápi je kosmopolitně rozšířen. S čápy se setkáme převážně v tropických oblastech



Afriky, do chladnějšího území se nastěhovalo jen několik z nich, na zimu však odlétají (Šťastný *et al.*, 1998).

### 3.3 Čáp simbil

Systematické zařazení čápa simbila (Obrázek č. 3) je podle Gaisler *et Zima* (2018) následující:

|           |                                       |
|-----------|---------------------------------------|
| Říše:     | živočichové (Animalia)                |
| Kmen:     | strunatci (Chordata)                  |
| Podkmen:  | obratlovci (Vertebrata)               |
| Třída:    | ptáci (Aves)                          |
| Podtřída: | letci (Neognathae)                    |
| Řád:      | čápi (Ciconiiformes)                  |
| Čeleď:    | čápovití (Ciconiidae)                 |
| Rod:      | čáp ( <i>Ciconia</i> )                |
| Druh:     | čáp simbil ( <i>Ciconia abdimii</i> ) |

Čáp simbil se svou výškou od 75 do 81 cm a hmotností okolo 1–3 kg patří k nejmenším z čápů (del Hoyo *et al.*, 1992). Svrchní stranu těla má tmavou, spodní stranu naopak bílou, na obličejí je jeho kůže modrá a červená, zobák má tříslově hnědý. Jeho nohy jsou šedé, lehce narůžovělé s výrazným růžovým páskem na běháku a chodidlech. Při letu je vidět velká bílá skvrna na hřbetě a kostřeci (Gosler., 1994). Vzhledem se samec od samice téměř neliší, samec je pouze o něco větší (del Hoyo *et al.*, 1992). Obvykle se nijak neozývá, jen slabě píská nebo klape zobákem. Tento druh čápa žije a migruje pouze v rámci Afriky, obývá především stepi a savany v blízkosti vod, nevyhýbá se ani sušším oblastem, polopouštím a lidským sídlištím (Šťastný *et al.*, 1998).

Čáp simbil se pohybuje v hejnech tisíců jedinců a potravu si shání ve volné přírodě, dovolí si ale i mírné přiblížení k civilizaci (Gosler, 1994). Živí se převážně větším hmyzem, jako jsou cvrčci a kobyly, sleduje především hejna sarančat. V menší míře se může živit také myšmi, žábami, ještěrkami a malými rybami (Brown *et al.*, 1993). Zajímavostí je, že se nebojí lovit potravu v blízkosti stepních požárů (Šťastný *et al.*, 1998). Aby se čáp simbil zbavil přebytečného tepla, při vysoké teplotě okolí stojí ve vodě s roztaženými křídly proti větru, chladný vzduch se tak dostane k břišním a podpažním nažinám. Čápi společně s kondory také vystřikují tekutý trus na dolní končetiny, což při odpařování vody vede taktéž k ochlazení organismu (Veselovský, 2001).



**Obrázek č. 3:** Čáp simbil v Zoo Praha (Copyright © Miroslav Heráň).

Způsobem života připomíná našeho čápa bílého. Hnízdo si zakládá v oblastech u lidských osad, ne však na domech, ale na stromech. Obvykle nehnízdí pouze jeden pár, ale celá kolonie pohromadě. Někdy bývají na jednom stromě i desítky hnízd (Hudec *et al.*, 1974). Hnízdí v době dešťů v severní Africe, v oblastech od Senegalu na východ do Etiopie a na jihozápadě Arábie (Gosler, 1994), v době sucha hnízdiště opouští a přelétá přes rovník do jižní a jihovýchodní části Afriky, kde tráví většina jedinců zbytek roku (del Hoyo *et al.*, 1992).

V době hnízdění přilétají nejdříve samci, kteří osídlují stará hnízda, nebo vyhledají místa nová, nejčastěji na stromech a skalách, kde stavějí hnízda z větví, trávy a listů (Brown *et al.*, 1993). Tvorba páru se stvrzuje různými postoji, syčivými hlasy a klapáním zobáku (Šťastný *et al.*, 1998). Samice snáší 1–3 vejce, v zajetí je pozorována inkubační doba 30–31 dní. Nejstarší sledovaný jedinec se v zajetí dožil 21 let (del Hoyo *et al.*, 1992).

### **3.4 Mikrosatelity**

Mikrosatelity jsou díky své struktuře, označovány někdy též jako repetice jednoduchých sekvencí, SSR (Simple Sequence Repeats) nebo krátké tandemové repetice, STR (Short Tandem Repeats) (Oliveira *et al.*, 2006). Jedná se o krátké, zpravidla 1–6 bp dlouhé, tandemově se opakující sekvence. Vyskytují se v prokaryotických i eukaryotických genomech, jak v protein kódujících, tak v protein nekódujících oblastech (Tóth *et al.*, 2000). Je pro ně typická vysoká mutační rychlost řádově  $10^{-2}$  až  $10^{-4}$ /lokus/generace. Příčina vysoké variability mikrosatelitů není zcela objasněna, za

hlavní zdroj je však považováno sklouznutí DNA polymerázy během replikace, tzv. replication slippage. Pak se jednotlivé alely liší navzájem svojí délkou, protože dojde ke ztrátě nebo získání jednotky repetice a lze je tak snadno po PCR separovat elektroforézou (Zima *et al.*, 2004, Anmarkrud *et al.*, 2008). Z mikrosatelitů jsou nejfrekventovanější dinukleotidové motivy jako  $(AC)_n$  a  $(AT)_n$ , dále také tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové motivy (Tóth *et al.*, 2000).

K výhodám mikrosatelitů patří vysoká proměnlivost, početnost a rozšíření po celém genomu, dále kodominantnost alel a možnost jejich přesné identifikace, jednoduchost analýzy a s využitím PCR je možné díky mikrosatelitům analyzovat také vymřelé organismy (Zima *et al.*, 2004). V poslední době mají mikrosatelity, pro jejich vysokou proměnlivost, rozsáhlé využití, například při studiu velikosti a struktury populací, při analýze paternity, při studiu genetické proměnlivosti a toku genů (Oliveira *et al.*, 2006). Nevýhodou mikrosatelitů je nutnost nalezení a identifikace vhodných primerů pro jejich amplifikaci. Pro druhy, které jsou zkoumány poprvé, je většinou nutné jednotlivé lokusy izolovat *de novo* a navrhnou vhodné primery (Zima *et al.*, 2004).

### 3.5 Mikrosatelity od zástupců z řádu tučňáci

Tučňáci (Sphenisciformes) jsou společně s čápy (Ciconiiformes) řazeni do kladu Aequorlitorניתhes (Prum *et al.*, 2015). Jsou to mořští ptáci, výborní plavci a potápěči přizpůsobení k životu v extrémně chladném podnebí, hnízdí nejčastěji na subarktických ostrovech. Jejich křídla mají tvar ploutví, proto ztratili schopnost létat (del Hoyo *et al.*, 1992, Burnie, 2002).

Řád tučňáci je rozšířen na jižní polokouli, zahrnuje jedinou čeleď tučňákovití (Spheniscidae), která sestává z 6 rodů, do kterých je řazeno 18 druhů (del Hoyo *et al.*, 1992). Dosud bylo v 11 studiích popsáno 147 polymorfních mikrosatelitů u 10 druhů z pěti rodů tučňáků (viz tabulka č. 1).

**Tabulka č. 1:** Rody a druhy patřící do řádu tučňáci (Sphenisciformes) podle del Hoyo *et al.* (2018) s počty mikrosatelitů (MS) pro jednotlivé druhy a s literárním zdrojem.

| Rod                | Druh  | Počet MS | Literární zdroj |
|--------------------|---|----------|-----------------|
| <i>Aptenodytes</i> | Tučňák císařský<br>( <i>A. forsteri</i> )       |          |                 |
|                    | Tučňák patagonský<br>( <i>A. patagonicus</i> )  |          |                 |
| <i>Eudyptes</i>    | Tučňák jižní skalní<br>( <i>E. chrysocome</i> ) |          |                 |

**Tabulka č. 1:** Pokračování.

| Rod               | Druh   | Počet MS    | Literární zdroj  |
|-------------------|--|-------------|--|
| <i>Eudyptes</i>   | Tučňák žlutorohý<br>( <i>E. chrysolophus</i> )         | 25          | Ahmed <i>et al.</i> , 2009   |
|                   | Tučňák severní skalní<br>( <i>E. moseleyi</i> )        |             |  |
|                   | Tučňák<br>novozélandský<br>( <i>E. pachyrhynchus</i> ) |             |  |
|                   | Tučňák snárský<br>( <i>E. robustus</i> )               |             |  |
|                   | Tučňák chocholatý<br>( <i>E. sclateri</i> )            |             |  |
|                   | Tučňák královský<br>( <i>E. schlegeli</i> )            |             |  |
| <i>Eudyptula</i>  | Tučňák nejmenší<br>( <i>E. minor</i> )                 | 8<br>20     | Billing <i>et al.</i> , 2007<br>Grosser <i>et Waters</i> ,<br>2014 |
|                   | Tučňáka žlutooký<br>( <i>M. antipodes</i> )            | 12          | Boessenkool <i>et al.</i> ,<br>2008                                |
| <i>Pygoscelis</i> | Tučňák kroužkový<br>( <i>P. adeliae</i> )              | 6<br>14     | Roeder <i>et al.</i> , 2001  |
|                   | Tučňák oslí<br>( <i>P. papua</i> )                     | 11          | Vienna <i>et al.</i> , 2017  |
|                   | Tučňák uzdičkový<br>( <i>P. antarctica</i> )           | 9<br>16     | Kang <i>et al.</i> , 2015  |
|                   | Tučňák Humboldtův<br>( <i>S. humboldti</i> )           | 7<br>5<br>1 | Schlosser <i>et al.</i> , 2003<br>Schlosser <i>et al.</i> , 2008   |
| <i>Spheniscus</i> | Tučňák magellanský<br>( <i>S. magellanicus</i> )       | 1           | Akst <i>et al.</i> , 2002  |
|                   | Tučňák galapážský<br>( <i>S. mendiculus</i> )          | 3           |  |
|                   | Tučňák brýlový<br>( <i>S. demersus</i> )               | 1<br>8      |  |

### 3.5.1 Rod *Eudyptes*

Do rodu *Eudyptes* je řazeno sedm druhů tučňáků. Polymorfní mikrosatelitní lokusy byly popsány pouze pro jeden druh v práci Ahmed *et al.* (2009).

#### Tučňák žlutorohý - 25 polymorfních mikrosatelitů

U tučňáka žlutorohého (*Eudyptes chrysolophus*) bylo izolováno a charakterizováno 25 mikrosatelitních lokusů.

Vzorky krve byly odebrány dospělým jedincům tučňáka žlutorohého žijícím v kolonii na místě zvaném Macaroni Cwm na Ptačím ostrově ležícím v souostroví Jižní

Georgie. Každému jedinci bylo z křídelní žíly odebráno 0,1 ml krve, která byla ihned vložena do 1,4 ml absolutního ethanolu. Genomická DNA byla extrahována octanem amonným. Následně byla zkonstruována mikrosatelitní knihovna, která byla rozšířena o di- a tetranukleotidové mikrosatelitní motivy. Ahmed *et al.* (2009) osekvenovali 288 transformovaných bakteriálních kolonií a našli tak 132 unikátních sekvencí obsahujících mikrosatelitní motivy. Použitím programu Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) navrhli páry primerů pro 32 těchto sekvencí, které dále testovali na 28 nepříbuzných jedincích tučňáka žltorohého. Po provedení PCR amplifikace bylo z 32 navržených primerů sedm vyřazeno, zbylých 25 párů primerů poskytlo polymorfni produkt se čtyřmi až 33 alelami, nejčastěji pak s osmi alelami (Ech009, Ech010, Ech011, Ech 020, Ech050 a Ech051). V případě lokusu Ech020 byla prokázána vazba na pohlavní chromozom Z. U šesti lokusů byla zjištěna značná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a u některých z nich také nulové alely.

Těchto 25 nalezených polymorfni mikrosatelitních lokusů bylo dále testováno pro jejich *cross-species* využití na třech nepříbuzných jedincích tučňáka patagonského, tučňáka oslího, tučňáka uzdičkového a tučňáka kroužkového. 17 mikrosatelitních lokusů bylo polymorfni aspoň u jednoho ze čtyř testovaných druhů tučňáků a osm mikrosatelitních lokusů bylo polymorfni u tří ze čtyř testovaných druhů tučňáků. I přesto, že byly polymorfni mikrosatelitové lokusy testovány pouze u tří jedinců od každého ze čtyř výše zmíněných druhů tučňáků, jsou pro své výsledky hodnoceny jako vhodné pro užití v dalších populačních studiích (Ahmed *et al.*, 2009).

### **3.5.2 Rod *Eudyptula***

Do rodu *Eudyptula* je řazen pouze jeden druh tučňáka. Pro tento druh bylo popsáno celkem 28 polymorfni mikrosatelitních lokusů ve dvou pracích (Billing *et al.*, 2007 a Grosser *et Waters*, 2014).

#### **Tučňák nejmenší - 8 polymorfni mikrosatelitů**

Billing *et al.* (2007) popsali osm polymorfni mikrosatelitů u tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*). Cílem izolace a charakterizace mikrosatelitních lokusů bylo zjištění paternity a struktury populace tučňáka nejmenšího.

Genomická DNA byla extrahována vysolovací metodou ze vzorků krve odebraných nepříbuzným jedincům tučňáka nejmenšího žijícím v kolonii Summerland na Filipově ostrově. Genomická DNA byla rozštěpána enzymem *Sau3A*, vzniklé fragmenty byly separovány agarózovou gelovou elektroforézou. Fragmenty o velikosti 400–900 bp

byly purifikovány z gelu a hybridizovány na  $(GAAA)_n$  a  $(GA)_n$  oligonukleotidy značené biotinem. Dále byly fragmenty amplifikovány a klonovány do pGEM vektoru (Promega). Transformované klony byly roztrženy pomocí colony PCR za použití specifických pGEM primerů,  $(TTC)_7$  a  $G(AG)_{13}$  primerů k detekci mikrosatelitů. Poté byly klony s mikrosatelity amplifikovány a PCR produkty purifikovány QIAquick PCR purifikačním kitem (Qiagen) a osekvenovány.

Autory bylo osekvenováno 18 klonů obohacených o  $(GA)_n$  sekvenční, pro devět z nich byly navrženy primery, protože obsahovaly sedm a více GA repetitivních. Také bylo autory osekvenováno 10 klonů obohacených o  $(GAAA)_n$  sekvenční, primery ale byly navrženy jen pro jeden z nich, protože obsahoval dostatečný počet GAA repetitivních.

Polymorfismus těchto mikrosatelitů byl testován pomocí PCR amplifikace u nejméně 20 nepříbuzných jedinců tučňáka nejmenšího pocházejících z Filipova ostrova a u pěti až 15 nepříbuzných jedinců z Troubridgeova ostrova. U tučňáků nejmenších pocházejících z Filipova ostrova byl jeden lokus monomorfní, a to lokus Emm4. U jedinců pocházejících z Troubridgeova ostrova byl také jeden lokus monomorfní, a to lokus Emm8. Lokusy Emm2 a Emm8 vykazovaly odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Nejvíce alel bylo detekováno na lokusu Emm2 a to 14 alel u 27 testovaných jedinců pocházejících z Filipova ostrova.

Ve studii byl testován také lokus B3-2 od tučňáka brýlového (Akst *et al.*, 2002). Po provedení *cross-species* PCR amplifikace lokusu B3-2 bylo zjištěno osm alel u 47 testovaných jedinců tučňáka nejmenšího z Filipova ostrova (Billing *et al.*, 2007).

### **Tučňák nejmenší - 20 polymorfních mikrosatelitů**

Grosser *et Waters* (2014) popsali ve své práci dalších 20 polymorfních mikrosatelitů pro tučňáka nejmenšího.

Genomická DNA byla extrahována fenol-chloroformovou metodou z krve tučňáků žijících v koloniích na Novém Zélandu a v Austrálii. Autory zajímaly především sekvenční s di-, tri-, a tetranukleotidovými motivy obsahující alespoň pět repetitivních jednotek. Pomocí softwaru MSATCOMMANDER v1.0.8 (Faircloth, 2008) byly navrženy páry primerů pro amplifikaci 346 sekvencí. PCR amplifikace byla provedena u 30 vybraných lokusů, 10 z nich neposkytlo žádný produkt, nebo byl produkt monomorfní. U zbylých 20 polymorfních mikrosatelitů bylo zjištěno od dvou (Em21 a Em29.2) do 26 (Em13) alel. Lokus Em15 vykazoval odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy ale pouze u jedinců pocházejících z populací žijících na Novém Zélandu.

Lokusy Em2, Em6 a Em28 pak vykazovaly odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy vždy pouze v jedné populaci, pravděpodobně v důsledku výskytu nulových alel (Grosser *et Waters*, 2014).

### **3.5.3 Rod *Megadyptes***

Do rodu *Megadyptes* je řazen pouze jeden druh tučňáků. Pro tento druh byly popsány polymorfní mikrosatelitní lokusy v práci Boessenkool *et al.* (2008).

#### **Tučňák žlutooký - 12 polymorfních mikrosatelitů**

U tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*) bylo autory Boessenkool *et al.* (2008) nalezeno 12 polymorfních mikrosatelitů.

Nejdříve byly sestaveny dvě genomické knihovny tučňáka žlutookého obohacené o repetice, ale proto, že bylo získáno málo pozitivních klonů, byla sestavena třetí genomická knihovna. Genomická DNA byla izolována za pomoci DNeasy Kitu (Qiagen) a štěpena restrikcí enzymem *MboI* nebo *RsaI*. Takto získaná DNA byla ligována do klonovacího vektoru pUC19 a DNA inzerty byly amplifikovány užitím M13 primerů. Produkty s repetitivními sekvencemi byly selektivně izolovány magnetickými částicemi značenými streptavidinem (Roche Applied Science). Poté byly fragmenty obsahující repetice ligovány do klonovacího vektoru pUC19 a transformovány One Shot Top kompetentními buňkami (Invitrogen). Z 2976 bakteriálních klonů přenesených na nylonovou membránu bylo nakonec 159 z nich amplifikováno a osekvenováno pomocí M13 primerů.

Boessenkool *et al.* (2008) navrhli celkem 58 párů primerů - 38 párů primerů z první a druhé genomické knihovny a 20 ze třetí genomické knihovny, amplifikace těchto primerů byla testována na DNA 12 nepříbuzných jedinců tučňáka žlutookého. Autory bylo nalezeno 12 polymorfních lokusů, které byly následně genotypizovány u 43 jedinců tučňáka žlutookého z Campbellova ostrova a které obsahovaly od dvou do osmi alel. Všechny lokusy pak byly v Hardy-Weinbergově rovnováze kromě lokusu Man47.

### **3.5.4 Rod *Pygoscelis***

Do rodu *Pygoscelis* jsou řazeny tři druhy tučňáků. Polymorfní mikrosatelitní lokusy byly popsány pro všechny tři druhy v pracích Roeder *et al.* (2001), Kang *et al.* (2015) a Vienna *et al.* (2017). Pro tento rod bylo nalezeno celkem 56 polymorfních mikrosatelitů.

## Tučňák kroužkový - 6 polymorfních mikrosatelitů

U tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*) bylo autory Roeder *et al.* (2001) izolováno a charakterizováno šest polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Vzorky krve byly odebrány 442 dospělým jedincům tučňáka kroužkového žijícím ve 13 koloniích v Antarktidě. Genomická DNA byla extrahována fenol-chloroformovou metodou nebo pomocí kitu Progenome II (Progen Industries). Izolovaná genomická DNA byla rozštěpena restriční endonukleázou *Sau3A* a byly zkonstruovány dvě genomické knihovny.

První genomická knihovna byla složena z fragmentů dlouhých 250–900 bp. Tyto fragmenty byly ligovány do plazmidu pUC18, dále transformovány do kompetentních buněk DH5 $\alpha$  a ponechány růst na agarovém médiu s ampicilinem. Poté byly kolonie přeneseny z agarózového média na nylonovou membránu, hybridizací se sondou byly identifikovány inzerty s repeticemi, které autoři osekvenovali. K pozitivním mikrosatelitním sekvencím byly pomocí programu Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky* 1998) navrženy primery (Roeder *et al.*, 2001).

Druhá genomická knihovna sestávala z fragmentů dlouhých 300–600 bp. Fragmenty DNA byly ligovány do SAULA / SAULB linkerů a byla provedena PCR se SAULA primery. Poté byly DNA fragmenty denaturovány a inkubovány na nylonové membráně a byla provedena další PCR. Dále autoři ligovali fragmenty do plazmidu pUC18 a transformovali do buněk MAX Efficiency (GIBCO BRL) a ponechali je růst na agarovém médiu s ampicilinem. Vzniklé kolonie byly opět přeneseny z agarózového média na nylonovou membránu. Pomocí hybridizace s (CA) $_n$  značenými sondami byly identifikovány inzerty s repeticemi a osekvenovány. Celkem bylo izolováno šest polymorfních mikrosatelitů.

Ke genotypizaci tučňáků bylo použito sedm mikrosatelitů. Šest polymorfních mikrosatelitních lokusů (TP500, AM12, AM13, AM3, RM3 a RM6) izolovaných od tučňáka kroužkového a sedmý polymorfní mikrosatelitní lokus (HrU2), který byl izolován od vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) (Ellegren, 1992, Primer *et al.*, 1996).

Pět mikrosatelitních lokusů (AM12, AM13, AM3, RM3 a RM6) bylo použito ke genotypizaci všech 442 vzorků DNA jedinců ze 13 kolonií v Antarktidě. Pro těchto pět mikrosatelitních lokusů byla u devíti ze 13 kolonií zjištěna odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Mikrosatelitní lokus TP500 sloužil ke genotypizaci jedinců ze západní Antarktidy a HrU2 pak sloužil ke genotypizaci jedinců z východní Antarktidy. Autory bylo nalezeno od čtyř (AM3) do 20 (AM13) alel na lokus (Roeder *et al.*, 2001).



## **Tučňák uzdičkový - 16 polymorfních mikrosatelitů**

Kang *et al.* (2015) popsali u tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*) 16 polymorfních mikrosatelitů.

Sedmi jedincům, pocházejícím z chráněné oblasti Narębski Point v Jižních Shetlandských ostrovech na Antarktidě, byla odebrána krev z křídelní žíly a uchována v roztoku EDTA. Genomická DNA byla extrahována pomocí DNeasy Blood and Tissue Kitu (Qiagen). Za užití QDD3 softwaru bylo zvoleno 30 repetitivních sekvencí, ke kterým byly pomocí programu Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) navrženy primery. Variabilita těchto 30 lokusů byla testována na 23 jedincích, u 29 lokusů byla zjištěna úspěšná amplifikace, kdy 16 z nich bylo polymorfních. Počet alel byl v rozmezí od dvou do devíti.

Pouze dva z 16 polymorfních lokusů (Pygantarc 11 a Pygantarc 18) vykazovaly odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Následně byla provedena *cross-species* PCR amplifikace vždy u dvou jedinců ze tří druhů tučňáků (tučňáka oslího, t. žlutorohého a t. kroužkového) se všemi 16 polymorfními mikrosatelity tučňáka uzdičkového. Úspěšně bylo amplifikováno 11 lokusů u tučňáka žlutorohého, 14 lokusů u tučňáka kroužkového a 15 lokusů u tučňáka oslího. Autoři neuvádějí, zda byly získané produkty polymorfní (Kang *et al.*, 2015).

## **Tučňák kroužkový - 14 polymorfních mikrosatelitů, t. oslí - 11 polymorfních mikrosatelitů a t. uzdičkový - 9 polymorfních mikrosatelitů**

Vienna *et al.* (2017) izolovali a charakterizovali celkem 34 polymorfních mikrosatelitů pro tučňáky z rodu *Pygoscelis*, z toho 14 mikrosatelitů pro tučňáka kroužkového (*P. adeliae*), 11 mikrosatelitů pro t. oslího (*P. papua*) a devět mikrosatelitů pro t. uzdičkového (*P. antarctica*).

Genomická DNA byla izolována z krve šesti jedinců od každého ze tří testovaných druhů tučňáků vysolovací metodou. Izolovaná genomická DNA byla naštípána pomocí systému CovarisS2220 (Thermo Fisher Scientific) na fragmenty o délce přibližně 160 bp, které byly dále purifikovány prostřednictvím SOLiD Library Column Purification Kitu (Thermo Fisher Scientific) a byly z nich vytvořeny genomické knihovny. Fragmenty byly autory osekvenovány a díky programu MISA vyhledali di-, tri- a tetranukleotidové tandemové repetice. Primery byly navrženy pro fragmenty o délce méně než 200 bp za použití programu Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 2000).

Ze 170 zvolených tetranukleotidových lokusů poskytlo 34 lokusů polymorfní produkt, alespoň u jednoho ze tří zkoumaných druhů tučňáků. Se všemi 34 páry primerů byla provedena *cross-species* PCR amplifikace, a to u devíti jedinců tučňáka oslího, u devíti jedinců t. uzdičkového a u osmi jedinců t. kroužkového. Ve výsledku bylo 15 lokusů polymorfních u všech tří druhů, 13 lokusů polymorfních u dvou druhů a šest lokusů polymorfních pouze u jednoho druhu. Celkem 30 mikrosatelitů poskytlo polymorfní produkt u tučňáka kroužkového, 25 mikrosatelitů polymorfní produkt u t. oslího a 22 mikrosatelitů polymorfní produkt u t. uzdičkového. Počet alel na lokus bylo v rozmezí dvě až osm. Odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy vykazovaly pouze dva lokusy pocházející od tučňáka oslího a tři lokusy pocházející od t. uzdičkového (Vienna *et al.*, 2017).

### **3.5.5 Rod *Spheniscus***

Do rodu *Spheniscus* jsou řazeny čtyři druhy tučňáků. Polymorfní mikrosatelitní lokusy byly popsány pro všechny čtyři druhy v pracích Akst *et al.* (2002), Schlosser *et al.* (2003), Schlosser *et al.* (2008) a Labuschagne *et al.* (2013). Celkem bylo pro tento rod nalezeno 26 polymorfních mikrosatelitů.

#### **Tučňák Humboldtův - 1 polymorfní mikrosatelit, t. magellanský - 1 polymorfní mikrosatelit, t. galapážský - 3 polymorfní mikrosatelity a t. brýlový - 1 polymorfní mikrosatelit**

Akst *et al.* (2002) ve své studii popsali a charakterizovali celkem šest polymorfních mikrosatelitů pro čtyři druhy tučňáků z rodu *Spheniscus* - t. Humboldtova, t. magellanského, t. galapážského a t. brýlového, s cílem porovnat genetickou diverzitu mezi tučňákem galapážským a magellanským.

Vzorky krve byly odebrány tučňákům galapážským žijícím na ostrovech Isabela a Fernandina, t. magellanským byla krev odebrána v oblasti Punta Tombo v Argentině a ZOO Baltimore poskytla vzorky krve t. brýlového, přesný údaj o geografickém původu vzorků krve t. Humboldtova autoři neuvádějí. Krev byla testovaným jedincům odebrána z křídelní žíly nebo z žíly na chodidle a uchována v lyzačním puftru. Genomická DNA byla poté extrahována pomocí DNeasy Blood and Tissue Kitu (Qiagen).

Optimalizována byla amplifikace šesti dinukleotidových lokusů, lokus B3-2 pro tučňáka brýlového, lokus M1-11 pro t. magellanského, lokus H2-6 pro t. Humboldtova a tři lokusy G2-2, G3-6 a G3-11 pro t. galapážského. Pět ze šesti získaných lokusů (B3-2, G2-2, G3-11, G3-6 a H2-6) bylo autory dále testováno pomocí *cross-species* PCR

amplifikace u 46 jedinců tučňáka galapážského a u 46 jedinců t. magellanského. V případě t. galapážského poskytly polymorfní produkt tři lokusy (G3-11, G3-6 a H2-6) a v případě t. magellanského poskytly polymorfní produkt čtyři lokusy (B3-2, G2-2, G3-6 a H2-6) z pěti testovaných. Odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy vykazoval pouze lokus G3-6 (Akst *et al.*, 2002).

### **Tučňák Humboldtův - 7 polymorfních mikrosatelitů**

Schlosser *et al.* (2003) popsali u tučňáka Humboldtova sedm polymorfních mikrosatelitů za účelem studia genetické diverzity a populační struktury tohoto druhu.

Vzorky krve byly odebrány 24 jedincům, žijícím v koloniích na pobřeží Peru a Chile. Genomická DNA byla z krve extrahována fenol-chloroformovou extrakcí. Autory byly vytvořeny páry primerů a to tak, že extrahovaná genomická DNA byla nejdříve rozštípaná restrikčním enzymem *Tsp509I*, fragmenty o délce 500–1000 bp byly izolovány a ligovány do TSPADSHORT/TSPADLONG linkerů a byla provedena PCR amplifikace. PCR produkty byly hybridizovány na biotinylované sondy s CA repeticemi. Po druhé PCR byly tyto obohacené fragmenty klonovány pomocí Invitrogen TA cloning kitu a umístěny na selektivní agarové médium (X-gal). Z bílých pozitivních kolonií byly izolovány a osekvenovány fragmenty s CA repeticemi a pomocí programu Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 1998) byly navrženy primery.

Ze sedmi úspěšně amplifikovaných mikrosatelitních lokusů pouze jeden (Sh2Ca22) vykazoval odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a byly nalezeny lokusy s pěti (Sh1Ca9) až 11 (Sh1Ca12) alelami. Těchto sedm polymorfních lokusů bylo dále testováno pomocí *cross-species* PCR amplifikace na dalších osmi druzích tučňáků z pěti rodů. Vzorky krve pocházely od jedinců žijících v zoologických zahradách v Severní Americe. U pěti druhů (t. magellanský, t. brýlový, t. oslí, t. jižní skalní a t. nejmenší) z osmi byl zjištěn polymorfismus u všech sedmi testovaných lokusů. U t. žlutorohého a t. patagonského byl zjištěn polymorfismus u pěti lokusů ze sedmi testovaných a v případě t. uzdičkového byl zjištěn polymorfismus pouze u jednoho lokusu (Sh2Ca22) ze sedmi testovaných (Schlosser *et al.*, 2003).

### **Tučňák Humboldtův - 5 polymorfních mikrosatelitů**

U tučňáka Humboldtova bylo autory Schlosser *et al.* (2009) nalezeno dalších pět polymorfních mikrosatelitů.

Vzorky krve byly odebrány z krční nebo hřbetní žíly 336 jedincům, pocházejícím ze čtyř lokalit v Peru a Chile. Genomická DNA byla izolována z krve fenol-

chloroformovou extrakcí. Autory bylo navrženo 28 mikrosatelitních párů primerů stejným způsobem jako ve výše popsané studii Schlosser *et al.* (2003). Nalezeno bylo 12 polymorfních dinukleotidových repetice, z toho bylo sedm lokusů popsáno již dříve (viz výše). K vizualizaci a charakterizaci všech genotypů byl použit DNA Analysis Systém Software, verze 4.3.9 (Beckman Coulter, Inc.). Na lokusech bylo detekováno od čtyř (Sh2Ca58) do 16 (Sh1Ca16 a Sh2Ca40) alel (Schlosser *et al.*, 2009).

### **Tučňák brýlový - 8 polymorfních mikrosatelitů**

Pro tučňáka brýlového bylo autory Labuschagne *et al.* (2013) izolováno a charakterizováno osm polymorfních mikrosatelitů.

Vzorky krve byly odebrány 25 dospělým jedincům z kolonie nacházející se v provincii KwaZulu v Jižní Africe. Extrakce genomické DNA z krve byla provedena pomocí DNeasy Blood and Tissue Kitu (Qiagen). Vzniklá genomická knihovna obohacená o mikrosatelitní repetice byla osekvenována a za použití programu MSATCOMMANDER, verze 0.8.1 (Faircloth, 2008) byly vyhledány mikrosatelitní motivy o délce dva až šest párů bází s nejméně osmi repeticemi. Z celkem 1791 identifikovaných motivů bylo vybráno 12 lokusů, ke kterým byly za pomoci programu Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 1997) navrženy páry primerů. Z celkem 12 amplifikovaných mikrosatelitních lokusů bylo osm polymorfních s počtem alel dvě (PNN05 a PNN07), čtyři (PNN01, PNN03, PNN06 a PNN08) a šest (PNN09 a PNN12). Odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy nevykazoval žádný z lokusů (Labuschagne *et al.*, 2013).

## **3.6 Univerzální ptačí mikrosatelity**

Doposud byly vytvářeny hlavně druhově specifické mikrosatelitní primery, Dawson *et al.* (2010) se však rozhodli pro nový způsob přípravy mikrosatelitních primerů, které budou přenositelné v rámci širokého spektra druhů ptáků. Ve dvou pracích popsali Dawson *et al.* (2010 a 2013) 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů - 36 EST ptačích mikrosatelitů a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Níže popsané mikrosatelitní lokusy jsou vhodné ke studiu polymorfismu, paternity a také pro populační studie.

### **3.6.1 EST ptačí mikrosatelity**

Dawson *et al.* (2010) navrhli metodou *in silico* celkem 36 párů primerů pro 35 EST mikrosatelitních lokusů, s vysokou sekvenční homologií mezi zebříčkou pestrá (*Taeniopygia guttata*) a kurem bankivským (*Gallus gallus*). Tyto dva velmi vzdálené druhy byly vybrány proto, aby měly získané mikrosatelitní páry primerů co

nejuniverzálnější využití v třídy ptáci. EST (Expressed Sequence Tags) sekvence byly autory zvoleny pro svou konzervativnost, jedná se o sekvence vytvořené reverzní transkripcí mRNA.

Pomocí nástrojů WU-BLAST a MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004) bylo vybráno 135 EST sekvencí od zebřičky pestré homologních s EST sekvencemi kura bankivského a ke 35 shodným hybridním sekvencím bylo navrženo 36 párů primerů za použití programu Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 2000), pro lokus TG08-024 byly navrženy dva páry primerů. Sekvence primerů byly navrženy tak, aby jejich teplota tání byla v rozmezí 54–61 °C, tedy co nejlíže teplotě 58 °C a maximální rozdíl teploty tání mezi forward a reverse primery byl 0,5 °C. U každého z testovaných párů primerů byl forward primer značen HEX nebo 6-FAM fluorescenční značkou.

Nalezené mikrosatelitní lokusy byly pojmenovány podle prvních písmen latinských názvů zdrojových druhů ptáků, tedy TG (*Taeniopygia* a *Gallus*). První dvě číslice za zkratkou informují o chromozómu, na kterém se lokus nachází a trojčíslí na konci udává přesnou pozici lokusu na chromozomu v Mbp.

U 52 druhů ptáků z 15 různých řádů byla provedena genotypizace s navrženými primery. Z testovaných druhů ptáků patřilo 22 druhů do řádu pěvci a zbylých 30 druhů spadalo do jiných řádů. U 33 mikrosatelitních lokusů z 35 testovaných byl zjištěn polymorfni produkt. Lokus TG09-014 poskytl u všech testovaných druhů monomorfní produkt a lokus TG01-086 neposkytl žádný produkt. Žádný z lokusů nevykazoval odchylku od Hardy-Weinergovy rovnováhy. U zebřičky pestré bylo zjištěno od dvou do šesti alel na lokus a u kura bankivského od dvou do pěti alel na lokus (Dawson *et al.*, 2010).

### **3.6.2 Konzervované ptačí mikrosatelity**

Dawson *et al.* (2013) izolovali a charakterizovali 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Ačkoli navázali na předchozí studii a páry primerů byly opět odvozeny z homologních sekvencí zebřičky pestré a kura bankivského, rozhodli se v tomto případě pracovat s celogenomovými daty a se sekvencemi, které obsahovaly minimálně osm repetitivních jednotek.

Shodné sekvence zebřičky pestré a kura bankivského byly vyhledány použitím nástroje MEGA3 (Kumar *et al.*, 2003) a páry primerů byly získány pomocí programu Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Páry primerů byly navrženy tak, aby byla jejich teplota tání v rozmezí 57–63 °C, s rozdílem mezi forward a reverse primery do 1,0 °C.

U každého z testovaných párů primerů byl opět forward primer značen HEX nebo 6-FAM fluorescenční značkou. Lokusy byly pojmenovány zkratkou CAM tedy Conserved Avian Microsatellite.

S 24 navrženými páry primerů byla provedena genotypizace, a to minimálně u čtyř jedinců z osmi druhů ptáků z řádu pěvci a u čtyř druhů z dalších řádů. V průměru 68 % z 94 % úspěšně amplifikovaných CAM lokusů bylo polymorfních u jedinců z řádu pěvci a 42 % z 95 % úspěšně amplifikovaných CAM lokusů bylo polymorfních u ostatních testovaných druhů. Žádný z lokusů nevykazoval odchylku od Hardy-Weinergovy rovnováhy a u polymorfních mikrosatelitních lokusů bylo zjištěno od dvou do 11 alel na lokus (Dawson *et al.*, 2013).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologickým materiálem pro praktickou část mé bakalářské práce byla genomická DNA získána z krve 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Vzorky krve byly poskytnuty Zoologickou zahradou Dvůr Králové. Izolaci genomické DNA fenol-chloroformovou metodou provedl vedoucí mé bakalářské práce. Výsledná koncentrace izolované genomické DNA rozpuštěné v TE pufru byla v rozmezí 5–15  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### 4.2 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza ( $5\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný -  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachner)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N' - methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin - TEMED (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Rain off - tekuté stěrače (Sheron)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan - Tris (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)

- Xylenová modř - Xylencyanol FF (AppliChem)

### 4.3 Použité roztoky

- **Akrylamid, 6% zásobní roztok**  
420 g močoviny  
484 ml deionizované vody  
50 ml 10x TBE  
150 ml 40% zásobního roztoku - akrylamid : N, N' - methylenbisakrylamid  
(19 : 1)  
Po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné láhvi v lednici
- **Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok**  
0,8 g dusičnanu stříbrného  
800 ml deionizované vody  
Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu
- **Fix/stop roztok**  
88 ml ledové kyseliny octové  
800 ml deionizované vody
- **Hydroxid sodný, 1 mol·dm<sup>-3</sup> roztok**  
40 g hydroxidu sodného  
Doplnit deionizovanou vodou do 1 l
- **Kyselina dusičná, 1% roztok**  
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
- **Nanášecí pufr pro elektroforézu**  
0,125 g bromfenolové modři  
0,125 g xylenové modři  
100 ml formamidu  
25 ml deionizované vody
- **Peroxodisíran amonný, 10% roztok**  
1 g peroxodisíranu amonného  
Rozpustit v 10 ml deionizované vody



Uchovávat v lednici

- **Polyakryamidový gel, 6% roztok**

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného

40 µl N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu

- **Reakční pufr pro PCR, 10x zásobní roztok**

1,211 g trishydroxymethylaminomethanu

80 ml deionizované vody

pH upravit pomocí HCl na hodnotu 9,0

3,73 g KCl

1 ml Triton X-100

Po rozpuštění doplnit na 100 ml

- **TBE pufr, 10x zásobní roztok**

108 g trishydroxymethylaminomethanu

55 g kyseliny borité

40 ml roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0

Doplnit deionizovanou vodou na 1 l

- **Vývojka**

24 g uhličitanu sodného

800 ml deionizované vody

Umístit do lednice, vychladit na teplotu nižší než 10 °C

Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl roztoku 1% roztoku thiosíranu sodného

#### **4.4 Laboratorní přístroje**

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiquette 0,5–10 µl (osmikanálová) (Thermo Labsystem)
- Mikropipety Finnpiquette 0,3 µl–1 ml (Thermo Labsystem)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl–1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)

- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler TC XP (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledové tříště Ice Markers 872281 (Brema)

#### 4.5 PCR amplifikace mikrosatelitů

Genomická DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila byla testována pomocí *cross-species* PCR amplifikace se 173 páry primerů. 113 párů primerů bylo původně navrženo pro amplifikaci mikrosatelitů ptáků z řádu tučňáci (viz tabulka č. 2) a 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů, z toho 36 párů primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů (viz tabulka č. 3).

**Tabulka č. 2:** Přehled mikrosatelitových lokusů z řádu tučňáci testovaných na polymorfismus u čápa simbila.

| Zdrojový druh  | Testovaný mikrosatelitový lokus   | Literární zdroj               |
|--|---|-------------------------------|
| Tučňák žlutorohý<br>( <i>Eudyptes chrysolophus</i> ) | Ech003, Ech005, Ech007, Ech008,<br>Ech009, Ech010, Ech011, Ech012,<br>Ech014, Ech020, Ech024, Ech029,<br>Ech030, Ech036, Ech039, Ech050,<br>Ech051, Ech060, Ech063, Ech065,<br>Ech071, Ech081, Ech091, Ech113,<br>Ech130            | Ahmed <i>et al.</i><br>(2009) |
| Tučňák uzdičkový<br>( <i>Pygoscelis antarctica</i> ) | Pygantarc02, Pygantarc03,<br>Pygantarc06, Pygantarc07,<br>Pygantarc11, Pygantarc15,<br>Pygantarc16, Pygantarc18,<br>Pygantarc19, Pygantarc22,<br>Pygantarc24, Pygantarc25,<br>Pygantarc26, Pygantarc27,<br>Pygantarc28, Pygantarc29 | Kang <i>et al.</i> (2015)     |

**Tabulka č. 2:** Pokračování.

| Zdrojový druh  | Testovaný mikrosatelitový lokus  | Literární zdroj                     |
|--|--|-------------------------------------|
| Tučňák kroužkový<br>( <i>P. adeliae</i> )            | AM3, AM12, AM13, TP500, RM3,<br>RM6  | Roeder <i>et al.</i><br>(2001)      |
| Tučňáka žlutooký<br>( <i>Megadyptes antipodes</i> )  | Man03, Man08, Man13, Man21,<br>Man22, Man27, Man39, Man47,<br>Man50, Man51, Man54, Man55                                       | Boessenkool <i>et al.</i><br>(2008) |
| Tučňák nejmenší<br>( <i>Eudyptula minor</i> )        | Emm1, Emm2, Emm3, Emm4,<br>Emm5, Emm6, Emm7, Emm8  | Billig <i>et al.</i><br>(2007)      |
|  | Em1, Em2, Em4, Em5, Em6.2, Em8,<br>Em9, Em12.2, Em13, Em14, Em15,<br>Em21, Em22, Em23, Em24, Em26,<br>Em27, Em28, Em29.2, Em30 | Grosser <i>et Waters</i><br>(2015)  |
| Tučňák Humboldtův<br>( <i>Spheniscus humboldti</i> ) | Sh1Ca9, Sh1Ca12, Sh1Ca16,<br>Sh1Ca17, Sh2Ca12, Sh2Ca21,<br>Sh2Ca22   | Schlosser <i>et al.</i><br>(2003)   |
|  | Sh2Ca31, Sh2Ca40, Sh2Ca49,<br>Sh2Ca55, Sh2Ca58   | Schlosser <i>et al.</i><br>(2009)   |
| H2-6   |  |                                     |
| Tučňák magellanský<br>( <i>S. magellanicus</i> )     | M1-11  | Akst <i>et al.</i> (2002)           |
| Tučňák galapážský<br>( <i>S. mendiculus</i> )        | G3-11, G3-6, G2-2  |                                     |
| Tučňák brylový<br>( <i>S. demersus</i> )             | B3-2   | Labuschange <i>et al.</i> (2013)    |
|  | PNN01, PNN03, PNN05, PNN06,<br>PNN07, PNN08, PNN09, PNN12  |                                     |

**Tabulka č. 3:** Přehled univerzálních ptačích mikrosatelitů testovaných na polymorfismus u čápa simbila.

| Zdroj                   | Testovaný mikrosatelitový lokus   | Literární zdroj                |
|-------------------------|---|--------------------------------|
| EST ptačí mikrosatelity | TG01-000, TG01-040, TG01-077,<br>TG01-086, TG01-092, TG01-114,<br>TG01-124, TG01-147, TG01-148,<br>TG02-078, TG02-088, TG02-120,<br>TG03-002, TG03-031, TG03-034,<br>TG03-035, TG03-098, TG04-004,<br>TG04-012, TG04-041, TG04-061,<br>TG05-030, TG05-046, TG05-053,<br>TG06-009, TG07-022, TG08-024(1),<br>TG08-024(2), TG09-014, TG11-011,<br>TG12-015, TG13-009, TG13-016,<br>TG13-017, TG22-001 | Dawson <i>et al.</i><br>(2010) |

**Tabulka č. 3:** Pokračování.

| Zdroj                            | Testovaný mikrosatelitový lokus  | Literární zdroj             |
|----------------------------------|--|-----------------------------|
| Konzervované ptačí mikrosatelity | CAM-01, CAM-02, CAM-03, CAM-04, CAM-05, CAM-06, CAM-07, CAM-08, CAM-09, CAM-10, CAM-11, CAM-12, CAM-13, CAM-14, CAM-15, CAM-16, CAM-17, CAM-18, CAM-19, CAM-20, CAM-21, CAM-22, CAM-23, CAM-24 | Dawson <i>et al.</i> (2013) |

Postup PCR amplifikace:

Každá PCR reakční směs byla připravena pro amplifikaci genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila jedním ze 173 výše uvedených párů primerů:

1. Složky PCR reakční směsi byly nejdříve rozmrazeny, poté byly krátce zvortexovány a zcentrifugovány.
2. Jednotlivé reagensie byly v požadovaném objemu (viz tabulka č. 4) napipetovány do označené 1,5ml mikrozkušavky.

**Tabulka č. 4:** Složení PCR reakční směsi pro 6 vzorků.

| Reagensie   | Objem [ $\mu\text{l}$ ] |
|---|-------------------------|
| Deionizovaná voda   | 44,4                    |
| Reakční pufr, 10x zásobní roztok                                  | 6,7                     |
| Roztok $\text{MgCl}_2$ ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )    | 4,0                     |
| Roztok dNTPs ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )              | 0,7                     |
| Primer F ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )                 | 3,3                     |
| Primer R ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )                 | 3,3                     |
| <i>aTaq</i> DNA polymeráza ( $5 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) | 1,0                     |

3. PCR reakční směs byla zvortexována a zcentrifugována.
4. Do 6 označených 0,2ml PCR mikrozkušavek byl napipetován 1  $\mu\text{l}$  předem zvortexované a zcentrifugované genomické DNA a 9  $\mu\text{l}$  PCR reakční směsi.
5. Mikrozkušavky byly uzavřeny a vloženy do termocykleru a byla spuštěna PCR reakce v daném časovém a teplotním profilu (viz tabulka č. 5). Teplota annealingu byla nejdříve nastavena pro všechny amplifikační reakce na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , později byla tato teplota u některých mikrosateitů upravena (zvýšena/snížena) tak, aby byl výsledný produkt hodnotitelný.

**Tabulka č. 5:** Teplotní a časový profil PCR reakce.

| Teplota | Čas   | Počet opakování | Proces     |
|---------|-------|-----------------|------------|
| 94 °C   | 5 min | 1x              | Denaturace |
| 94 °C   | 30 s  |                 | Denaturace |
| 50 °C   | 30 s  | 35x             | Annealing  |
| 72 °C   | 30 s  |                 | Elongace   |
| 72 °C   | 7 min | 1x              | Elongace   |

#### 4.6 Elektroforetická separace a vizualizace PCR produktů

Pro elektroforetickou separaci byl zvolen 6% polyakrylamidový gel o tloušťce 0,4 mm. Rozměr velkého skla byl 330 x 420 mm a rozměr malého skla byl 330 x 390 mm. Samotná elektroforetická separace pak byla provedena ve vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrce S2 Whatman Biometra za denaturujících podmínek.

1. Plochy velkého a malého skla, které se později dotýkaly gelu, byly pomocí kartáče omyty vodou se saponátem. Poté byly obě tyto plochy skel 2x opláchnuty deionizovanou vodou a 2x 96% ethanolem a vždy osušeny papírovými utěrkami.
2. Plocha velkého skla, opláchnutá vodou a 96% ethanolem, byla dále ošetřena přípravkem na odpuzování vody (Rain-off) a po zaschnutí 2x omyta deionizovanou vodou a osušena papírovými utěrkami.
3. Malé sklo bylo umístěno do digestoře na polystyrenovou podložku a plocha skla, která se později dotýkala gelu, byla ošetřena 1 ml roztoku molekulárního lepidla. Po zaschnutí bylo sklo 4x omyto 96% ethanolem a osušeno papírovými utěrkami.
4. Velké sklo bylo umístěno do digestoře na polystyrenovou podložku ošetřenou stranou nahoru. Po delších stranách velkého skla byly umístěny dva spacersy o tloušťce 0,4 mm. Na takto připravené velké sklo bylo umístěno malé sklo ošetřenou plochou dolů. Spacersy byly podélně zarovnané s okraji skel a zároveň byly gummy spacerů těsně přiloženy k hranám malého skla. Obě skla byla v místě spacerů sepnuta čtyřmi klipsy.
5. V kádince byl připraven 6% roztok polyakrylamidového gelu, opatrně promíchán a ihned rovnoměrně nalit mezi připravená skla. Nakonec do místa, kde byl nalit gel, byl zasunut rovnou stranou, asi 5 mm hluboko, hřebínek. Toto místo bylo sepnuto čtyřmi klipsy a minimálně hodinu byl gel ponechán polymerizovat.

6. Po ztuhnutí gelu byly odstraněny všechny klipsy a skla s gelem byla vodou a kartáčem omyta od zbytků polyakrylamidového gelu. Svrchní strana malého skla byla důkladně osušena papírovými utěrkami.
7. Skla s gelem byla umístěna do elektroforetické komůrky kratším sklem směrem k hliníkové desce a hranou s hřebínkem směrem nahoru a pevně utáhnuta šrouby. Katodový a anodový prostor byl zalit 0,5x TBE pufrem. Poté byl vytáhnut hřebínek a vzniklá mezera byla vyčištěna od nečistot a bublin proudem 0,5x TBE pufru z injekční stříkačky.
8. Katodový a anodový prostor byl uzavřen a elektroforetická komůrka byla elektrodami připojena ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu. Jako limitní faktor byla nastavena hodnota výkonu na 90 W (napětí 3000 V, proudu 150 mA) a gel byl v těchto podmínkách 30 minut nahříván.
9. Během nahřívání gelu byly připraveny vzorky, ke kterým bylo napipetováno 5  $\mu$ l nanášecího pufru. Pět minut před nanesením do gelu byly vzorky vloženy do termocykleru a 3 minuty denaturovány při 94 °C. Po denaturaci byly vzorky ihned umístěny do ledové tříště, aby nedošlo k renaturaci.
10. Po 30 minutách nahřívání byl zdroj stejnosměrného elektrického proudu odpojen. Byl otevřen katodový prostor a mezera pro hřebínek byla opět vyčištěna proudem 0,5x TBE pufru z injekční stříkačky od zbytků polyakrylamidu a močoviny. Do vyčištěné mezery byl vsunut hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu.
11. Osmikanálovou pipetou bylo do gelu mezi zoubky hřebínku naneseno vždy po 1,8  $\mu$ l vzorku.
12. Po nanesení všech vzorků byl katodový prostor uzavřen a připojen ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu, jako limitní faktor byla nastavena hodnota výkonu na 70 W (napětí 3000 V, proudu 150 mA) a byla zahájena 1,5–3hodinová separace vzorků.
13. V průběhu elektroforetické separace byl připraven fix/stop roztok, 1% roztok kyseliny dusičné, 0,1% roztok  $\text{AgNO}_3$  a vývojka. Vývojka byla vložena do chladničky, aby došlo k vychlazení na 4 °C a 0,1% roztok  $\text{AgNO}_3$  byl umístěn do tmy.
14. Po uplynutí doby elektroforetické separace byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu, byly odpojeny elektrody a byl uvolněn šroub, který umožnil odtok 0,5x TBE pufru z katodového prostoru do sběrné misky.

15. Skla s gelem byla vyjmuta a položena na misku malým sklem vzhůru. Hřebínek a spacery byly opatrně vytáhnuty a čepelí nože byla od sebe skla oddělena.
16. Malé sklo bylo umístěno do fotomisky na třepačce přilnutým gelem směrem nahoru a zalito fix/stop roztokem. Po 20 minutách působení byl fix/stop roztok slit zpět do baňky a sklo s gelem bylo 3x důkladně promyto asi 1–1,5 l deionizované vody.
17. Fotomiska s gelem byla umístěna zpět na třepačku a gel byl zalit 1% roztokem kyseliny dusičné. Po 4 minutách působení byl roztok vylit do odpadu a sklo s gelem bylo 4x důkladně promyto asi 1–1,5 l deionizované vody.
18. Sklo s gelem bylo vloženo do jiné fotomisky na třepačce a zalito 0,1% roztokem  $\text{AgNO}_3$  s přidanými 1200  $\mu\text{l}$  formaldehydu.
19. Po 30 minutách působení 0,1% roztoku  $\text{AgNO}_3$  na gel byl roztok slit zpět do zásobní láhve. Sklo s gelem bylo maximálně na 10 vteřin umístěno do předem nachystané fotomisky s deionizovanou vodou a poté vloženo do nové fotomisky na třepačce.
20. Do vychlazené vývojkou bylo těsně před použitím napipetováno 1200  $\mu\text{l}$  formaldehydu a 160  $\mu\text{l}$  1% roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Sklo s gelem bylo zalito takto připravenou vývojkou a bylo pozorováno vyvíjení hnědošedých, stříbrem se barvících, proužků PCR produktů.
21. Poté, co došlo k dostatečnému zbarvení proužků, byl k vývojce přidán fix/stop roztok a vyvíjení bylo ukončeno. Když se přestaly tvořit bublinky  $\text{CO}_2$ , bylo sklo s gelem přesunuto na 2 minuty do fotomisky s deionizovanou vodou.
22. Podepsané sklo bylo usušeno v sušárně při 60 °C po dobu 60 minut.
23. Suchý gel by vyhodnocen na negatoskopu a následně pro uchování informací naskenován do počítače.
24. Sklo s vyhodnoceným gelem bylo namočeno do 1 mol·dm<sup>-3</sup> roztoku 1 NaOH, ve kterém došlo po několika hodinách k odlepení gelu od skla. Sklo bylo následně pomocí kartáče omyto vodou se saponátem a opláchnuto deionizovanou vodou.

## 5 Výsledky

Náplní praktické části mé bakalářské práce byla *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila (*Ciconia abdimii*) s cílem nalezení polymorfních mikrosatelitních lokusů. Provedla jsem amplifikaci celkem 173 párů primerů, 113 z nich bylo navrženo pro amplifikaci ptáků z řádu tučňáci. Dále jsem testovala amplifikaci 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů, z toho bylo 36 párů primerů navrženo pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů

Na začátku experimentu jsem všechny mikrosatelitní páry primerů testovala při teplotě *annealingu* 50 °C, po provedení PCR amplifikace byly produkty separovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou po dobu 90 minut. Následně byly parametry experimentu - teplota *annealingu*, koncentrace hořčnatých iontů a čas elektroforetické separace optimalizovány. V případě, že nebyl při teplotě 50 °C získán žádný produkt, byla teplota nasedání primerů při PCR reakci snížena na 48 °C. Pokud ani při této teplotě nebyl produkt získán, byla teplota snížena až na 46 °C a u čtyř vzorků dokonce na 44 °C. Pokud byl naopak získán příliš výrazný produkt a nebylo možné odečíst genotyp, byla teplota *annealingu* naopak zvýšena, a to podle potřeby postupně až na 69 °C. U některých vzorků byl v průběhu experimentu upravován objem hořčnatých iontů v PCR mixu. Ve výsledku ale bylo potřeba objem snížit jen u jednoho mikrosatelitního lokusu, a to konkrétně v případě lokusu Em23 na polovinu původního objemu. Pro dva mikrosatelitní lokusy CAM-05 a TG01-148 byla prodloužena doba elektroforetické separace z původních 90 na 180 minut.

Na vzorcích šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila jsem otestovala všech 113 párů primerů navržených pro řád tučňáci a 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů. Ve výsledku poskytlo celkem 21 mikrosatelitních lokusů polymorfní produkt, z toho 14 mikrosatelitních lokusů navržených pro řád tučňáci a sedm univerzálních ptačích mikrosatelitů (viz tabulka č. 6). U šesti mikrosatelitních lokusů se mi ani po úpravách podmínek PCR reakce nepodařilo opakovaně získat žádný produkt, konkrétně se jednalo o lokusy G2-2, CAM-02, CAM-15, CAM-18, Man39 a Pygantarc22. Zbylých 146 mikrosatelitních lokusů poskytlo monomorfní produkt. Po genotypizaci polymorfních mikrosatelitních lokusů u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila jsem zjistila od dvou do devíti alel.



**Tabulka č. 6:** Charakteristika 21 polymorfních mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. Ve sloupcích tabulky jsou uvedeny zdrojové druhy, jednotlivé lokusy s Accession number podle databáze GeneBank, sekvence primerů, jednotky repetice, teplota annealingu -  $T_a$ , čas elektroforetické separace a počet alel.

| Zdroj  | Lokus<br>(Acc. No.)              | Sekvence primerů (5'→3')                                  | Jednotka<br>repetice | $T_a$<br>[°C] | Čas<br>separace<br>[min] | Počet<br>alel |
|--|----------------------------------|---|----------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| Tučňák žltorohý<br>( <i>Eudyptes chrysolophus</i> )  | <b>Ech007</b><br>(FM878338)      | F: CAGTGAAGCATTCTCTCGCAGAAC<br>R: AAGCTTGGTGCCCGTATCTTTG  | CTTT                 | 68            | 90                       | 2             |
|  | <b>Ech011</b><br>(FM878342)      | F: CACAGCACTGTGACAGAAGCA<br>R: TTAAGTGGTTCGATTTGTCAGTCTTT | GT                   | 66            | 90                       | 3             |
|  | <b>Ech020</b><br>(FM878351)      | F: GCTCCCTTGCAAACGAAACC<br>R: AAACGTGGATAGACAGATGCAGAGAG  | CTTT                 | 56            | 90                       | 3             |
|  | <b>Ech030</b><br>(FM878361)      | F: TGACGCCGCAGGGACTTC<br>R: GCTCAGCTCTTGCTCACAGTTTCAG     | CTAT                 | 67            | 90                       | 2             |
|  | <b>Ech036</b><br>(FM878367)      | F: GAGAGGGTTCAGAATGACATCACG<br>R: GTCCATGGGAGCAGACCTGAG   | GT                   | 69            | 90                       | 4             |
| Tučňák žlutooký<br>( <i>Megadyptes antipodes</i> )   | <b>Man27</b><br>(EU267114)       | F: GATCCTGAGAAGAGAGACAG<br>R: GGCTGTTCATTTTGTCAC          | GA/CA/<br>TG/GCA     | 62            | 90                       | 3             |
|  | <b>Man47</b><br>(EU267116)       | F: ATACCTCCAGAATGGCTG<br>R: CACTAAGGGTGACCAAGG            | TGA                  | 57            | 90                       | 2             |
| Tučňák uzdičkový<br>( <i>Pygoscelis antarctica</i> ) | <b>Pygantarc29</b><br>(KP316226) | F: TGTCCAAAATCCTGGAAAGTG<br>R: CCAAAGAGCCCTGAGCA          | AG                   | 55            | 90                       | 2             |
| Tučňák nejmenší<br>( <i>Eudyptula minor</i> )        | <b>Emm2</b><br>(DQ837730)        | F: AGCCTACATGACTGCAAAGC<br>R: TGGCTTCTACACATCTTCTGG       | CT/CTTT/CTTTT        | 48            | 90                       | 2             |
|  | <b>Emm8</b><br>(DQ852599)        | F: TGCACACTAGCAGATACGG<br>R: GACAAATTGTGCTTGTCAGC         | CA/CT                | 61            | 90                       | 2             |

Tabulka č. 6: Pokračování.

| Zdroj  | Lokus<br>(Acc. No.)           | Sekvence primerů (5'→3')                                    | Jednotka<br>repetice | Ta<br>[°C] | Čas<br>separace<br>[min] | Počet<br>alel |
|--|-------------------------------|---|----------------------|------------|--------------------------|---------------|
| Tučňák nejmenší<br>( <i>Eudyptula minor</i> )        | <b>Em5</b><br>(KM272224)      | F: CGGAGACCTTGCATCTTACC<br>R: CAGTCCTGTACCTCCCTCAC          | AAAT                 | 56         | 90                       | 3             |
|  | <b>Em23 *</b><br>(KM272234)   | F: GATGCATGTGGAGGAAGTGC<br>R: GGCAACATGGTAGCTGACAC          | CA                   | 60         | 90                       | 3             |
| Tučňák Humboldtův<br>( <i>Spheniscus humboldti</i> ) | <b>Sh2Ca12</b><br>(AF540010)  | F: TCAGTGTACGAGCCAGAAGG<br>R: CTAGGATCCCGGCTTTTGTC          | T/CA/A               | 53         | 90                       | 2             |
|  | <b>Sh2Ca58</b><br>(AY435091)  | F: TACAGCAATGCAGCGTGTGT<br>R: ACCTGGTAGAGGGCAGTAGT          | GT                   | 66         | 90                       | 3             |
| EST ptačí mikrosatelity                              | <b>TG01-077</b><br>(CK305147) | F: GGTATGTTCAGTTATCAAAAACAAGC<br>R: AAATGGCAGGTAAGGATACTCTC | A/CA                 | 65         | 90                       | 3             |
|  | <b>TG01-148</b><br>(CK301512) | F: TTGCAACACATTCTAATATTGC<br>R: TTTAAAGTACATCAAACAACAAAATC  | AT/AC                | 52         | 180                      | 3             |
|  | <b>TG04-061</b><br>(CK235034) | F: GACAATGGCTATGAAATAAATTAGGC<br>R: AGAAGGGCATTGAAGCACAC    | A/AG/AT              | 66         | 90                       | 3             |
|  | <b>TG11-011</b><br>(CK308096) | F: ACAAACTAAGTACATCTATATCTGAAG<br>R: TAAATACAGGCAACATTGG    | AT                   | 60         | 90                       | 3             |
| Konzervované ptačí<br>mikrosatelity                  | <b>CAM-05</b><br>(HG518763)   | F: TTACACAGACTGCAAACCGC<br>R: CTGTTKCTCTAGTAATGAGATCCTG     | CA                   | 50         | 180                      | 9             |
|  | <b>CAM-11</b><br>(HG518769)   | F: TGGTACAGGGACAGCAAACC<br>R: AGATGCTGRGAGCGGATG            | GT                   | 66         | 90                       | 2             |
|  | <b>CAM-24</b><br>(HG518782)   | F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC<br>R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG          | CA                   | 65         | 90                       | 2             |

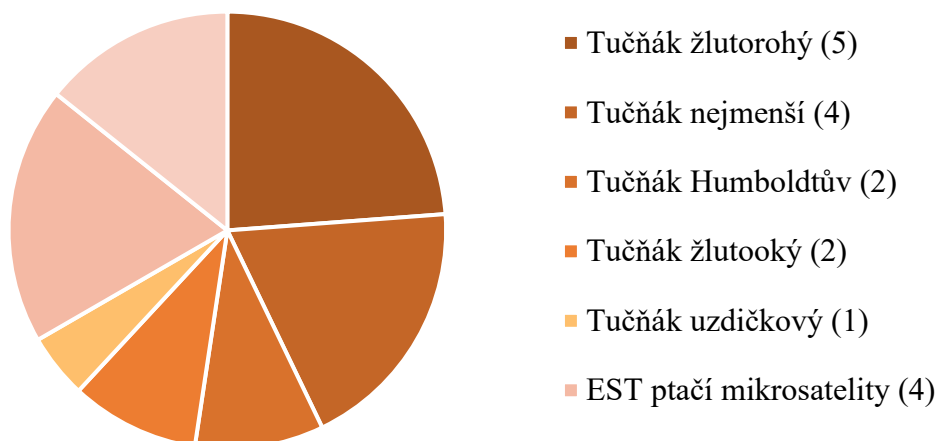
\* - snížený objem roztoku MgCl<sub>2</sub> v PCR mixu ze 4 µl na 2 µl.

Ze všech 173 mikrosatelitních lokusů, které jsem testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace na vzorcích šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila, bylo získáno 21 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitních lokusů tedy činila 12,14 %.

Z 21 polymorfních mikrosatelitních lokusů bylo 14 mikrosatelitních lokusů navržených pro řád tučňáci, konkrétně pět pro tučňáka žltorohého, dva pro t. žltookého, jeden pro t. uzdičkového čtyři pro t. nejmenšího a dva pro t. Humboldtova. Procentuální úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitních lokusů navržených pro řád tučňáci byla 12,39 %. Zjištěný počet alel byl dvě až čtyři, nejvíce lokusů bylo dvoualelových, a to sedm. Tři alely byly detekovány u šesti lokusů a čtyři alely pouze u jednoho lokusu (Ech036).

Zbýlých sedm polymorfních mikrosatelitních lokusů jsem získala za použití párů primerů pro univerzální ptačí mikrosatelity. Páry primerů navržené pro EST ptačí mikrosatelity poskytly polymorfní produkt u čtyř z nich a páry primerů pro konzervovaných ptačích mikrosatelitů poskytly polymorfní produkt u tří z nich, přehledně v grafu č. 1. Pro univerzální ptačí mikrosatelity je procentuální úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů 11,66 %. Polymorfní produkty měly dvě (CAM-11 a CAM-24), tři (TG01-077, TG01-148, TG04-061 a TG11-011) a v jednom případě (CAM-05) až devět alel (viz tabulka č. 7).

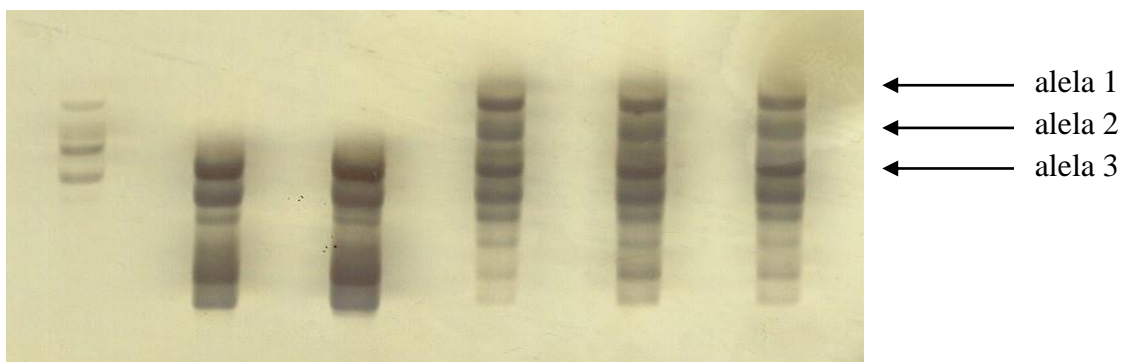
**Graf č. 1:** Rozdělení 21 polymorfních mikrosatelitních lokusů nalezených u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila podle zdroje. Hnědou barvou jsou označeni tučňáci a růžovou univerzální ptačí mikrosatelity. Čísla v závorkách udávají počet polymorfních mikrosatelitních lokusů získaných z každého zdroje.



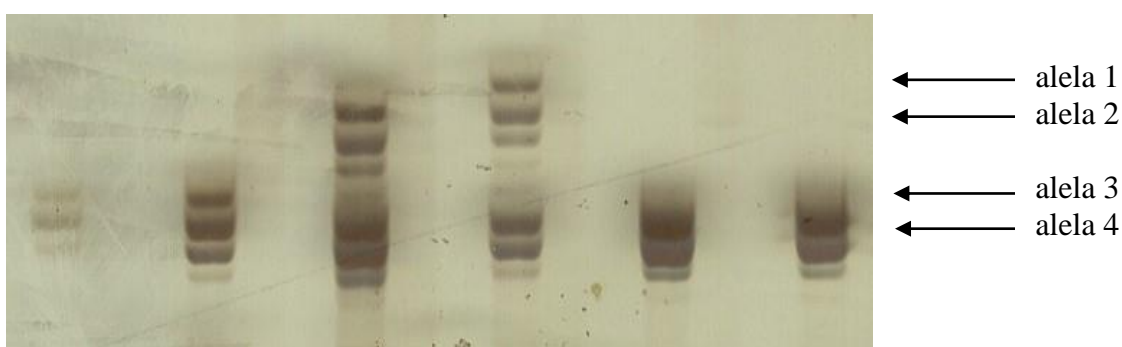
**Tabulka č. 7:** Genotypy 21 polymorfních mikrosatelitních lokusů získaných amplifikací u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila. V tabulce je s genotypem uveden i název lokusu, zdrojový druh a počet alel.

| Zdroj                                  | Lokus              | Počet alel | Genotypy šesti jedinců |     |     |     |     |     |
|--|--------------------|------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|  |                    |            | 1                      | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |
| Tučňák<br>žlutorohý                    | <b>Ech007</b>      | 2          | 1/1                    | 1/2 | 1/1 | 1/1 | 1/2 | 1/1 |
|  | <b>Ech011</b>      | 3          | 1/2                    | 3/3 | 3/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 |
|  | <b>Ech020</b>      | 3          | 3/3                    | 3/3 | 3/3 | 1/2 | 1/2 | 3/3 |
|  | <b>Ech030</b>      | 2          | 1/1                    | 1/1 | 1/1 | 1/2 | 1/1 | 1/1 |
|  | <b>Ech036</b>      | 4          | 3/3                    | 3/4 | 2/4 | 1/4 | 4/4 | 4/4 |
| Tučňák<br>žlutooký                     | <b>Man27</b>       | 3          | 3/3                    | 1/2 | 2/3 | 2/3 | 2/2 | 1/2 |
|  | <b>Man47</b>       | 2          | 1/1                    | 1/1 | 1/2 | 1/2 | 1/1 | 1/1 |
| Tučňák<br>uzdičkový                    | <b>Pygantarc29</b> | 2          | 2/2                    | 2/2 | 1/2 | 1/2 | 2/2 | 2/2 |
| Tučňák<br>nejmenší                     | <b>Emm2</b>        | 2          | 2/2                    | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 |
|  | <b>Emm8</b>        | 2          | 1/1                    | 2/2 | 1/2 | 2/2 | 1/2 | 2/2 |
|  | <b>Em5</b>         | 3          | 1/1                    | 1/3 | 1/3 | 1/1 | 1/3 | 2/2 |
|  | <b>Em23</b>        | 3          | 2/2                    | 2/3 | 3/3 | 2/3 | 1/3 | 2/2 |
| Tučňák<br>Humboldtův                   | <b>Sh2Ca12</b>     | 2          | 1/2                    | 2/2 | 1/2 | 2/2 | 2/2 | 1/2 |
|  | <b>Sh2Ca58</b>     | 3          | 1/1                    | 1/1 | 1/3 | 2/2 | 1/3 | 1/1 |
|  | <b>TG01-077</b>    | 3          | 1/3                    | 1/3 | 1/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 |
| EST ptačí<br>mikrosatelity             | <b>TG01-148</b>    | 3          | 2/2                    | 2/3 | 1/2 | 2/2 | 2/2 | 1/2 |
|  | <b>TG04-061</b>    | 3          | 1/3                    | 1/1 | 1/2 | 1/1 | 1/1 | 1/1 |
|  | <b>TG11-011</b>    | 3          | 1/1                    | 2/2 | 2/2 | 1/2 | 1/3 | 1/2 |
| Konzervované<br>ptačí<br>mikrosatelity | <b>CAM-05</b>      | 9          | 4/6                    | 2/5 | 1/9 | 4/8 | 4/7 | 3/5 |
|  | <b>CAM-11</b>      | 2          | 2/2                    | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 |
|  | <b>CAM-24</b>      | 2          | 1/2                    | 2/2 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/2 |

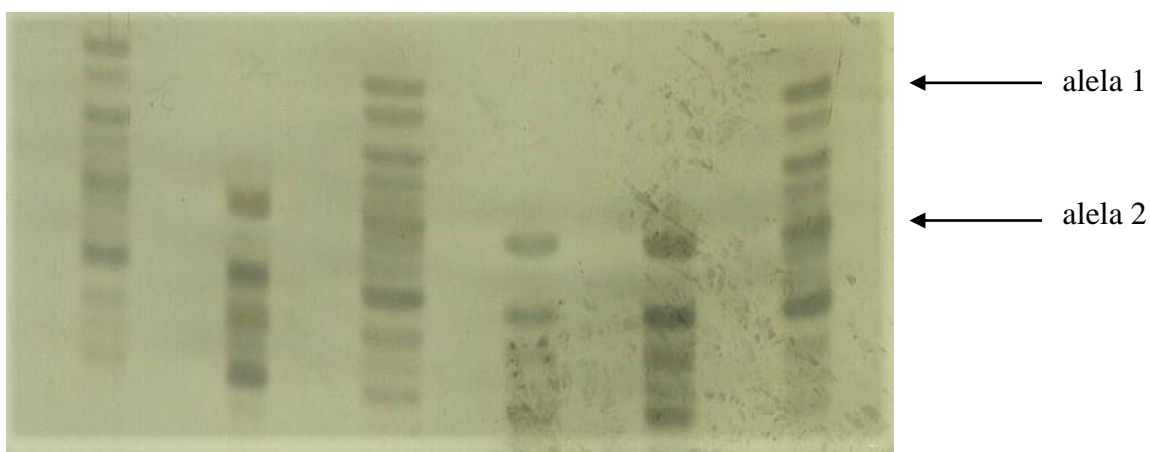
Ne všechny polymorfní mikrosatelitní lokusy získané *cross-species* PCR amplifikací u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila byly snadno hodnotitelné. Například u lokusu TG04-061 nebo CAM-05, u kterého jsem získala devět alel, bylo hodnocení velmi problematické. Některé z dobře hodnotitelných polymorfních mikrosatelitních lokusů jsem znázornila na následujících elektroforetogramech. Na obrázku č. 1 je znázorněn lokus Ech011 se třemi alelami, na obrázku č. 2 lokus Ech036 se čtyřmi alelami, na obrázku č. 3 lokus Sh2Ca12 se dvěma alelami, na obrázku č. 4 lokus Sh2Ca58 se třemi alelami, na obrázku č. 5 lokus TG01-077 se třemi alelami a na obrázku č. 6 lokus CAM-24 se dvěma alelami.



**Obrázek č. 4:** Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Ech011. Testováním šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila byly získány tři alely označené šípkami.  $T_a$  byla stanovena na 68 °C a čas elektroforetické separace na 90 minut.



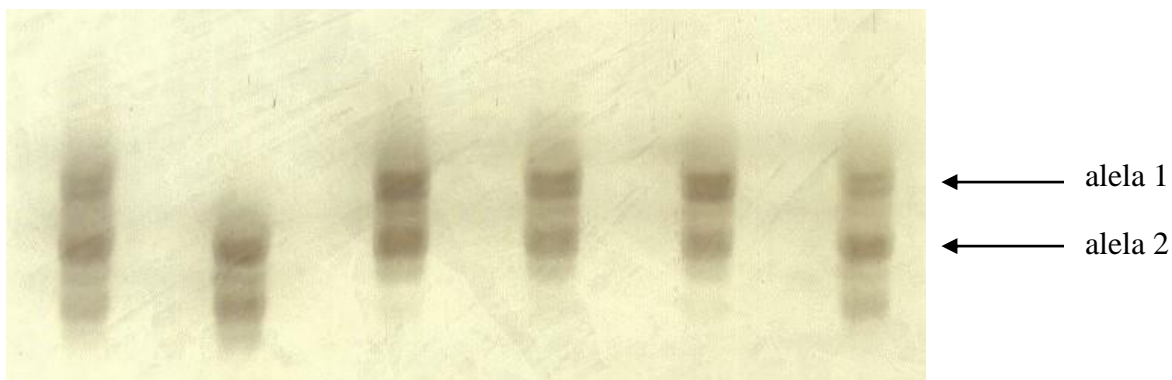
**Obrázek č. 5:** Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Ech036. Testováním šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila byly získány čtyři alely označené šípkami.  $T_a$  byla stanovena na 69 °C a čas elektroforetické separace na 90 minut.



**Obrázek č. 6:** Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Sh2Ca12. Testováním šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila byly získány dvě alely označené šípkami.  $T_a$  byla stanovena na 53 °C a čas elektroforetické separace na 90 minut.



**Obrázek č. 7:** Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Sh2Ca58. Testováním šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila byly získány tři alely označené šípkami.  $T_a$  byla stanovena na 66 °C a čas elektroforetické separace na 90 minut.



**Obrázek č. 8:** Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu CAM-24. Testováním šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila byly získány dvě alely označené šípkami.  $T_a$  byla stanovena na 65 °C a čas elektroforetické separace na 90 minut.

## 6 Diskuse

Cílem praktické části mé bakalářské práce bylo nalézt polymorfní mikrosatelitní lokusy pomocí *cross-species* PCR amplifikace 173 párů primerů na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Ze 173 testovaných mikrosatelitů bylo navrženo 113 pro ptáky z řádu tučňáci. Zbýlých 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů představovalo 24 párů primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 36 pro konzervované ptačí mikrosatelity. Polymorfní produkt poskytlo 21 mikrosatelitních lokusů s počtem alel od dvou do devíti.

Ve své práci jsem testovala 113 mikrosatelitních lokusů pro devět druhů tučňáků (t. žlutorohý, t. žlutooký, t. kroužkový, t. uzdičkový, t. nejmenší, t. Humboldtův, t. magellanský, t. galapážský a t. brýlový) z již popsanych 147 mikrosatelitních lokusů pro 10 druhů tučňáků. Polymorfní produkt poskytly mikrosatelitní lokusy navržené pro tučňáka žlutorohého, t. žlutookého, t. uzdičkového, t. nejmenšího a t. Humboldtova.

Pro tučňáka žlutorohého popsali Ahmed *et al.* (2009) 25 polymorfních mikrosatelitních lokusů, přičemž pět z nich poskytlo při mém testování pomocí *cross-species* PCR amplifikace u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila polymorfní produkt. Všech 25 mikrosatelitů bylo autory testováno při  $T_a$  (teplotě *annealingu*) 60 °C. Lokus Ech007 byl testován na 28 jedincích t. žlutorohého a poskytl 18 alel. Já jsem u čápa simbila našla při  $T_a$  68 °C dvě alely. Lokus Ech011 byl autory testován na 27 jedincích a poskytl osm alel, v mé práci poskytl při  $T_a$  66 °C tři alely. Lokus Ech020, u kterého byla autory zjištěna u t. žlutorohého vazba na pohlaví, byl testován na 13 samicích a čtyřech samcích, u samic bylo získáno osm alel a u samců tři alely. Při mém testování byly při  $T_a$  56 °C detekovány tři alely. Lokus Ech30 byl testován na 28 jedincích a bylo získáno 11 alel, v mém případě poskytl při  $T_a$  67 °C pouze dvě alely. Posledním mnou detekovaným polymorfním mikrosatelitním lokusem byl lokus Ech036. Na rozdíl od autorů Ahmed *et al.* (2009), kteří jej testovali na 28 jedincích t. žlutorohého a zjistili 16 alel, jsem při testování za  $T_a$  69 °C získala 4 alely.

Pro tučňáka žlutookého popsali Boessenkool *et al.*, (2008) 12 polymorfních mikrosatelitních lokusů, dva z nich poskytly při mém testování na vzorcích šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila polymorfní produkt. Lokus Man27, který autoři testovali při  $T_a$  48 °C na vzorcích 43 jedinců t. žlutookého, poskytl dvě alely, já jsem tento lokus testovala při  $T_a$  62 °C a zjistila jsem tři alely. Druhý polymorfní lokus Man47

autoři testovali opět při 48 °C na vzorcích 43 jedinců a detekovali čtyři alely, v mém případě byly při  $T_a$  57 °C zjištěny pouze dvě alely.

Pro tučňáka uzdičkového popsali Kang *et al.*, (2015) 16 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Po testování těchto lokusů na šesti nepříbuzných jedincích čápa simbila jsem získala pouze jeden polymorfní produkt, a to v případě lokusu Pygantarc29. Autoři tento lokus testovali na vzorcích 23 jedinců při měnící se  $T_a$  během 42 cyklů a získali tři alely. Já jsem u lokusu Pygantarc29 získala při  $T_a$  55 °C dvě alely.

Ve dvou pracích (Billing *et al.*, 2007 a Grosser *et Waters*, 2014) bylo pro tučňáka nejmenšího popsáno celkem 28 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Já jsem při testování těchto lokusů na šesti nepříbuzných jedincích čápa simbila zjistila polymorfismus u čtyř mikrosatelitních lokusů. Billing *et al.* (2007) testovali lokus Emm2 při  $T_a$  56 °C na 27 jedincích t. nejmenšího žijících na Filipově ostrově a získali 14 alel, dále tento lokus testovali na 15 jedincích žijících na Troubridgeově ostrově a získali osm alel. Já jsem lokus Emm2 testovala při  $T_a$  48 °C a získala jsem dvě alely. Lokus Emm8 autoři testovali také při  $T_a$  56 °C na 26 jedincích z Filipova ostrova a získali tři alely, tento lokus testovali také na pěti jedincích z Troubridgeova ostrova, u všech těchto jedinců byl ale produkt monomorfní. Já jsem amplifikací lokusu Emm8 při  $T_a$  61 °C získala dvě alely.

Grosser *et Waters* (2014) testovali lokus Em5 při  $T_a$  60 °C a našli osm alel, já jsem u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila našla při  $T_a$  56 °C tři alely. Lokus Em23 autoři testovali také při  $T_a$  60 °C a získali devět alel, já jsem při stejné  $T_a$  a se sníženou koncentrací  $MgCl_2$  v PCR mixu na polovinu našla tři alely.

Pro tučňáka Humboldtova bylo ve třech pracích (Akst *et al.*, 2002, Schlosser *et al.*, 2003 a Schlosser *et al.*, 2008) popsáno celkem 13 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Já jsem při testování na šesti nepříbuzných jedincích čápa simbila pozorovala polymorfismus u dvou lokusů - Sh2Ca12 a Sh2Ca58. Schlosser *et al.* (2003) testovali lokus Sh2Ca12 při  $T_a$  60 °C na vzorcích 24 jedinců t. Humboldtova a našli šest alel. Já jsem tento lokus testovala při  $T_a$  53 na šesti vzorcích čápa simbila a získala jsem dvě alely. Druhý lokus Sh2Ca58 testovali Schlosser *et al.* (2008) při  $T_a$  63 °C a našli čtyři alely, já jsem při  $T_a$  66 °C získala tři alely.

U většiny ze 14 získaných polymorfních mikrosatelitních lokusů byl při testování na šesti nepříbuzných jedincích čápa simbila detekován výrazně nižší počet alel, než je uveden v původních zdrojích. Například u všech pěti mnou získaných polymorfních mikrosatelitních lokusů pocházejících od tučňáka žltorohého bylo autory Ahmed *et al.* (2009) získáno minimálně o pět alel více. V některých případech byl ale počet alel



podobný, například u lokusu Man 47 jsem získala dvě alely a autoři Boessenkool *et al.* (2008) čtyři alely. Lokusy Pygantarc29 a Sh2Ca58 měly v mém případě pouze o jednu alelu méně, než uvádějí původní autoři. U lokusu Emm8 zjistili autoři u dvou populací t. nejmenšího monomorfní produkt a polymorfní produkt se třemi alelami, já jsem získala produkt se dvěma alelami. V jednom případě jsem získala dokonce vyšší počet alel, než získali původní autoři. Jednalo se o lokus Man 27, u kterého jsem našla tři alely a autoři Boessenkool *et al.* (2008) pouze dvě alely.

Mikrosatelitní páry primerů navržené pro zbylé čtyři druhy tučňáka, 20 mikrosatelitů pro t. kroužkového, jeden mikrosatelit pro t. magellanského, tři mikrosatelity pro t. galapážského a devět mikrosatelitů pro t. brýlového, neposkytly při testování na vzorcích šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila žádný polymorfní produkt.

Z 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů popsanych ve dvou pracích (Dawson *et al.*, 2010 a Dawson *et al.*, 2013) poskytlo polymorfní produkt, při amplifikaci genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila, sedm z nich. Konkrétně čtyři z 36 navržených párů primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a tři z 24 párů primerů navržených pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Dawson *et al.* (2010) testovali všech 36 mikrosatelitních párů primerů při stejné  $T_a$  56 °C. Lokus TG01-077 byl autory testován na čtyřech nepříbuzných jedincích zebřičky pestré, získány byly tři alely. Při mém testování na šesti nepříbuzných jedincích čápa simbila byly za  $T_a$  65 °C získány také tři alely. Všechny tři zbylé mikrosatelitní lokusy TG01-148, TG04-061, a TG11-011 poskytly při testování na čtyřech nepříbuzných jedincích zebřičky pestré dvě alely. Já jsem při testování všech tří lokusů na vzorcích čápa simbila získala tři alely. Lokus TG01-148 jsem testovala při  $T_a$  52 °C, lokus TG04-061 při  $T_a$  66 °C a lokus TG11-011 při  $T_a$  60 °C. Následně autoři testovali všech 36 párů primerů na 22 dalších druzích ptáků (17 druhů z řádu pěvci a 5 druhů z jiných řádů). Mnou získaný polymorfní lokus TG01-077 byl v práci Dawson *et al.* (2010) polymorfní u devíti druhů ptáků, lokus TG01-148 byl polymorfní u 10 druhů, lokus TG04-061 byl polymorfní u 13 druhů a lokus TG11-011 byl polymorfní u 15 druhů ze všech 22 testovaných druhů, podrobněji v tabulce č. 8.

**Tabulka č. 8:** Porovnání počtu získaných alel u čtyř EST ptačích mikrosatelitů (TG01-077, TG01-148, TG04-061 a TG11-011) polymorfních u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila s počty alel u dalších 22 druhů ptáků (Dawson *et al.*, 2010). V tabulce je uveden název lokusu a testovaný druh se zjištěným počtem alel, v závorce je uveden počet testovaných jedinců. Písmenem M je označen monomorfní produkt a písmenem P polymorfní produkt.

| Testovaný druh   | Lokus    |          |          |          |
|--|----------|----------|----------|----------|
|  | TG01-077 | TG01-148 | TG04-061 | TG11-011 |
| Zebříčka pestrá<br>( <i>Taeniopygia guttata</i> )          | 3 (4)    | 2 (4)    | 2 (4)    | 2 (4)    |
| Kur bankivský<br>( <i>Gallus gallus</i> )                  | 2 (4)    | M (4)    | M (4)    | M (4)    |
| Amada Gouldové<br>( <i>Erythrura gouldiae</i> )            | P (8-16) | M (4)    | M (4)    | 2 (4)    |
| Linduška kanárská<br>( <i>Anthus berthelotii</i> )         | M (4)    | M (4)    | M (3)    | M (1)    |
| Vrabc domácí<br>( <i>Passer domesticus</i> )               | M (4)    | 3 (4)    | 2 (4)    | 2 (4)    |
| Zvonek zelený<br>( <i>Carduelis chloris</i> )              | 2 (4)    | P (4)    | P (4)    | P (4)    |
| Křivka obecná<br>( <i>Loxia curvirostra</i> )              | M (4)    | P (4)    | P (4)    | P (4)    |
| Pěnkava obecná<br>( <i>Fringilla coelebs</i> )             | M (4)    | P (4)    | P (4)    | P (4)    |
| Hýl obecný<br>( <i>Pyrrhula pyrrhula</i> )                 | M (4)    | P (4)    | P (4)    | P (4)    |
| Vlaštovka australská<br>( <i>Petrochelidon ariel</i> )     | M (4)    | 4 (4)    | 2 (4)    | 3 (4)    |
| Sýkora modřínka<br>( <i>Cyanistes caeruleus</i> )          | M (4)    | M (4)    | 2 (4)    | 2 (4)    |
| Sýkora koňadra<br>( <i>Parus major</i> )                   | M (4)    | M (4)    | M (4)    | M (4)    |
| Rákosník velký<br>( <i>Acrocephalus arundinaceus</i> )     | M (4)    | M (4)    | P (4)    | 2 (4)    |
| Sýkořice vínoprsá<br>( <i>Paradoxornis webbiana</i> )      | M (4)    | 3 (4)    | M (4)    | 3 (4)    |
| Kos černý<br>( <i>Turdus merula</i> )                      | M (4)    | M (4)    | M (4)    | 4 (4)    |
| Timálievec pruhokřídlý<br>( <i>Pomatostomus ruficeps</i> ) | M (4)    | M (4)    | 2 (6)    | 2 (4)    |
| Straka americká<br>( <i>Pica hudsonia</i> )                | 2 (4)    | 2 (4)    | 2 (4)    | M (4)    |
| Popeláč šedý<br>( <i>Struthidea cinerea</i> )              | 2 (4)    | M (4)    | M (4)    | 2 (4)    |
| Kulík mořský<br>( <i>Charadrius alexandrinus</i> )         | 2 (4)    | M (4)    | M (4)    | M (4)    |

**Tabulka č. 8:** Pokračování.

| Testovaný druh  | Lokus    |          |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|
|   | TG01-077 | TG01-148 | TG04-061 | TG11-011 |
| Kolibřík rezavolesklý<br>( <i>Selasphorus rufus</i> )   | 2 (4)    | 2 (6-8)  | 3 (6-8)  | M (4)    |
| Sova pálená<br>( <i>Tyto alba</i> )                     | 2 (8-20) | M (4)    | 7 (194)  | M (4)    |
| Agapornis růžohrdlý<br>( <i>Agapornis roseicollis</i> ) | M (4)    | M (4)    | M (4)    | 2 (4)    |
| Čáp simbil<br>( <i>Ciconia abdimii</i> )                | 3 (6)    | 3 (6)    | 3 (6)    | 3 (6)    |

Dawson *et al.* (2013) popsali dále 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Při testování všech těchto párů primerů na vzorcích čápa simbila jsem získala polymorfní produkt u tří z nich, a to u lokusu CAM-05, CAM-11 a CAM-24. Autoři testovali všechny lokusy jako v předchozí práci při  $T_a$  56 °C. Lokus CAM-05 testovali na sedmi nepříbuzných jedincích zebřičky pestré a získali šest alel, dále lokus testovali na čtyřech nepříbuzných jedincích kura bankivského a získali dvě alely. Já jsem testováním tohoto lokusu na vzorcích čápa simbila získala při  $T_a$  50 °C získala devět alel. Lokusy CAM-11 a CAM-24 testovali autoři na 12 nepříbuzných jedincích zebřičky pestré a v obou případech získali šest alel, u čtyř nepříbuzných jedinců kura bankivského detekovali u obou lokusů monomorfní produkty. Já jsem testováním lokusu CAM-11 na vzorcích čápa simbila získala při  $T_a$  66 °C dvě alely. Poslední lokus CAM-24 jsem testovala při  $T_a$  65 °C a získala jsem také dvě alely. Všechny 24 párů primerů bylo autory zkoumáno na dalších 12 druzích ptáků. Mnou testovaný polymorfní lokus CAM-05 vykazoval polymorfismus u dalších 10 druhů ptáků s počtem alel na lokus od dvou do sedmi. Lokus CAM-11 byl polymorfní u dalších devíti druhů ptáků a lokus CAM-24 u čtyř druhů ptáků, oba s počtem alel na lokus od dvou do šesti, přehledně v tabulce č. 9.

**Tabulka č. 9:** Porovnání počtu získaných alel u tří konzervovaných ptačích mikrosatelitů (CAM-05, CAM-11 a CAM-24) polymorfních u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila s počty alel dalších 12 druhů ptáků (Dawson *et al.*, 2013). V tabulce je uveden název lokusu a testovaný druh se zjištěným počtem alel, v závorce je uveden počet testovaných jedinců. Písmenem M je označen monomorfní produkt.

| Testovaný druh   | Lokus  |        |        |
|--|--------|--------|--------|
|  | CAM-05 | CAM-11 | CAM-24 |
| Zebříčka pestrá ( <i>Taeniopygia guttata</i> )         | 6 (7)  | 6 (12) | 6 (12) |
| Kur bankivský ( <i>Gallus gallus</i> )                 | 2 (4)  | M (4)  | M (4)  |
| Linduška kanárská ( <i>Anthus berthelotii</i> )        | 3 (4)  | 3 (4)  | M (4)  |
| Vrabc domácí ( <i>Passer domesticus</i> )              | 7 (10) | 4 (11) | M (12) |
| Pěnkava obecná ( <i>Fringilla coelebs</i> )            | 3 (4)  | 2 (3)  | M (4)  |
| Hýl obecný ( <i>Pyrrhula pyrrhula</i> )                | 3 (4)  | 3 (4)  | M (4)  |
| Sýkora koňadra ( <i>Parus major</i> )                  | 4 (4)  | M (4)  | M (4)  |
| Kos černý ( <i>Turdus merula</i> )                     | 4 (4)  | M (4)  | M (4)  |
| Sova pálená ( <i>Tyto alba</i> )                       | 4 (4)  | 2 (3)  | M (4)  |
| Pokřovník zelený ( <i>Acanthisitta chloris</i> )       | 0 (4)  | 3 (4)  | 2 (4)  |
| Buřňáček dlouhokřídlý ( <i>Hydrobates leucorhous</i> ) | 2 (6)  | 3 (6)  | 6 (6)  |
| Mandelík hajní ( <i>Coracias garrulus</i> )            | M (4)  | 2 (4)  | 4 (4)  |
| Čáp simbil ( <i>Ciconia abdimii</i> )                  | 9 (6)  | 2 (6)  | 2 (6)  |

Všechny čtyři mikrosatelity (TG01-077, TG01-148, TG04-061 a TG11-011), získané s použitím párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity, které byly při testování na vzorcích šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila polymorfní, poskytly produkt s podobným počtem alel, jako je uvedeno v původním zdroji (Dawson *et al.*, 2010). U dvou polymorfních lokusů (CAM-11 a CAM-24), které jsem získala s použitím párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity, byl zjištěný počet alel výrazně nižší, než je uvedeno v původním zdroji (Dawson *et al.*, 2013). V případě polymorfního lokusu CAM-05 byl mnou zjištěný počet alel naopak vyšší, než je uvedeno v původním zdroji (Dawson *et al.*, 2013). U lokusu CAM-05 jsem získala nejvyšší počet alel, a to devět.

Mikrosatelity navržené pro řád tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity byly v rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci testovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace na genomické DNA již v předešlých bakalářských pracích celkem na osmi druzích vodních ptáků.

Pechová (2014) testovala ve své bakalářské práci celkem 135 mikrosatelitů na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Ze všech testovaných mikrosatelitů bylo 77 navržených pro řád tučňáci,

34 párů primerů pocházelo od EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů od konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Polymorfni produkt získala celkem u 17 mikrosatelitů, z toho pocházelo devět mikrosatelitů z řádu tučňáci, jeden mikrosatelit z EST ptačích mikrosatelitů a tři mikrosatelity z konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Tři mikrosatelity (Ech007, Ech020 a Man27), navržené pro řád tučňáci, poskytly polymorfni produkt jak u nesyta indomalajského, tak i u čápa simbila a pouze mikrosatelit CAM-11, řazený mezi konzervované ptačí mikrosatelity, poskytl produkt u nesyta indomalajského i u čápa simbila.

Filipová (2016) testovala ve své bakalářské práci amplifikaci celkem 171 mikrosatelitů na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Testováno bylo 113 mikrosatelitů navržených pro devět druhů z řádu tučňáci, dále 34 EST ptačích mikrosatelitů a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Nalezla celkem 19 polymorfni mikrosatelitů, šest mikrosatelitů z řádu tučňáci, pět konzervovaných ptačích mikrosatelitů a osm EST ptačích mikrosatelitů. Janušová (2017) ve své diplomové práci analyzovala na DNA 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče páry primerů pro mikrosatelitní lokusy odvozené od zástupců z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity, které byly v práci Filipové (2016) nalezené jako polymorfni. Všechny šest mikrosatelitů pocházejících od zástupců z řádu tučňáci a pět konzervovaných ptačích mikrosatelitů poskytlo jako v práci Filipové (2016) polymorfni produkt. Z původních osmi polymorfni mikrosatelitních lokusů, odvozených od konzervovaných ptačích mikrosatelitů, v práci Janušové (2017) nebyl polymorfni lokus TG02-120, naopak mikrosatelitní lokus TG09-014 dříve označený jako monomorfni byl polymorfni. Žádný z mikrosatelitů pro řád tučňáci neposkytl polymorfni produkt u potápky roháče a zároveň u čápa simbila, ale dva mikrosatelity (CAM-11 a CAM-24) pro konzervované ptačí mikrosatelity a dva EST ptačí mikrosatelity (TG04-061 a TG11-011) poskytly polymorfni produkt u obou testovaných druhů (viz tabulka č. 10).

Šuláková (2017) testovala ve své bakalářské práci *cross-species* PCR amplifikaci celkem 173 mikrosatelitů na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Testovala stejně jako já 113 lokusů z osmi druhů řádu tučňáci, 36 párů primerů pro amplifikaci 35 EST ptačích mikrosatelitů a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Polymorfni produkt nalezla celkem u 14 mikrosatelitů, osm z nich pocházelo z řádu tučňáci, jeden z EST ptačích mikrosatelitů a pět z konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Pouze jeden lokus (Emm8) navržený pro řád tučňáci poskytl polymorfni produkt u pelikána skvrnozobého i u čápa simbila. Dále

byl u obou testovaných druhů polymorfní jeden mikrosatelit (TG11-011) z EST ptačích mikrosatelitů a tři (CAM-05, CAM-11 a CAM-24) z konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Zlochová (2017) ve své bakalářské práci testovala polymorfismus pomocí *cross-species* PCR amplifikace 171 párů primerů na šesti nepříbuzných jedincích plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). 113 párů primerů bylo navrženo pro devět druhů tučňáků, 34 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity a 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity. Celkem u 23 mikrosatelitů získala polymorfní produkt, z toho 16 mikrosatelitů pocházelo od tučňáků, tři byly EST ptačí mikrosatelity a čtyři byly konzervované ptačí mikrosatelity. Šuláková (2019) ve své diplomové práci analyzovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského 23 mikrosatelitních lokusů, které ve své bakalářské práci Zlochová (2017) označila jako polymorfní. Z 16 polymorfních mikrosatelitních lokusů navržených pro řád tučňáci nebyl u dvou lokusů (Em9 a Pygantarc07) polymorfismus potvrzen, lokusy byly monomorfní. U lokus Emm5, který byl původně monomorfní nalezla Šuláková (2019) tři alely. Všechny tři EST ptačí mikrosatelity (TG03-002, TG04-061 a TG022-001) a čtyři konzervované ptačí mikrosatelity (CAM-06, CAM-11, CAM-20 a CAM-24) byly opět polymorfní. Osm polymorfních lokusů nalezených u plameňáka karibského - Ech011, Ech030, Man24, Man47, Em23, TG04-061, CAM-11 a CAM-24 poskytlo polymorfní produkt i u čápa simbila, podrobně v tabulce č. 10.

Klaclová (2018) testovala *cross-species* PCR amplifikací na šesti nepříbuzných jedincích plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*), stejně jako Šuláková (2017), celkem se 173 páry primerů. 113 párů primerů pro devět druhů z řádu tučňáci, 36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity a 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity. Nalezla 24 polymorfních lokusů s 25 polymorfními produkty (lokus PNN08 měl dvě polymorfní místa), z toho bylo 13 párů primerů navrženo pro řád tučňáci, pět pro EST ptačí mikrosatelity a šest pro konzervované ptačí mikrosatelity. U osmi lokusů, které byly polymorfní u plameňáka růžového - Ech011, Ech030, Em23, Man27, Man47, TG01-148, CAM-11 a CAM-24, jsem i já zjistila polymorfismus.

Adámková (2019) provedla ve své bakalářské práci *cross-species* PCR amplifikaci na šesti nepříbuzných jedincích pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) se stejným počtem mikrosatelitů jako Šuláková (2017) a Klaclová (2018). Získala 12 polymorfních mikrosatelitů, z toho osm pocházelo z řádu tučňáci, dva z EST ptačích mikrosatelitů a dva z konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Kopečná (2020) ve své

diplovové práci analyzovala na DNA 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického 12 mikrosatelitních lokusů, které ve své bakalářské práci Adámková (2019) označila jako polymorfní. U všech 12 mikrosatelitních lokusů byl opět zjištěn polymorfismus. Pouze tři mikrosatelitní lokusy (Emm8, CAM-24 a TG11-011) byly polymorfní zároveň u pelikána afrického a čápa simbila, detailně v tabulce č. 10.

Kremlová (2019) ve své bakalářské práci testovala prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace na šesti nepříbuzných jedincích pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) stejný počet mikrosatelitů jako Šuláková (2017), Klaclová (2018) a Adámková (2019). Pomocí 34 párů primerů našla celkem 35 polymorfních mikrosatelitních produktů (lokus TG13-016 měl dvě polymorfní místa), 18 párů primerů bylo původně navrženo pro řád tučňáci, devět pro EST ptačí mikrosatelity a sedm pro konzervované ptačí mikrosatelity. Získala tedy nejvíce polymorfních mikrosatelitů pocházejících z řádu tučňáci a z univerzálních ptačích mikrosatelitů testovaných na druhích z kladu Aequorlitorornithes. Celkem šest mikrosatelitů (Ech011, Em23, TG01-148, TG04-061, CAM-05 a CAM-11) polymorfních u pelikána bílého bylo polymorfních zároveň u čápa simbila.

V rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci byla provedena *cross-species* PCR amplifikace se 173 páry primerů u pěti nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) (Nádvorník, osobní sdělení). Ze 113 párů primerů navržených pro vybrané druhy z řádu tučňáci, byl nalezen pouze jeden polymorfní mikrosatelit, a to Ech008. Dále byl z 36 EST ptačích mikrosatelitů testovaných u pelikána kadeřavého polymorfní jeden mikrosatelit TG03-098 a z 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů poskytly polymorfní produkt dva z nich (CAM-17 a CAM-24). Všechny čtyři získané polymorfní lokusy měly dvě alely. Pouze jeden mikrosatelit (CAM-24) byl polymorfní u pelikána kadeřavého a zároveň u čápa simbila.

**Tabulka č. 10:** Souhrn polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů, které byly získány *cross-species* PCR amplifikací u čápa simbila a jejich porovnání s výsledky dalších osmi druhů ptáků z kladu Aequorlitorornithes, testovaných se stejnými mikrosatelity. V tabulce je uveden název lokusu a počet alel nalezených u daného druhu. V závorkách je uveden počet testovaných jedinců. Pokud byl produkt monomorfní je označen písmenem M, zkratka NT znamená, že daný lokus nebyl u tohoto druhu testován.

| Lokus              | Druh                       |                                       |                                   |  |                                       |                                       |                                    |                                  |  |
|--------------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--|
|                    | Čáp simbil<br>(tato práce) | Nesyt indomalajský<br>(Pechová, 2014) | Potápka roháč<br>(Janušová, 2017) | Pelikán skvrnozobý<br>(Šuláková, 2017) | Plameňák karibský<br>(Šuláková, 2019) | Plameňák růžový<br>(Klaczalová, 2018) | Pelikán africký<br>(Kopečná, 2020) | Pelikán bílý<br>(Kremlová, 2019) | Pelikán kadeřavý<br>(nepublikovaná data) |
|                    | (6)                        | (6)                                   | (13)                              | (6)                                    | (30)                                  | (6)                                   | (12)                               | (6)                              | (5)                                      |
| <b>Ech007</b>      | 2                          | 2                                     | M                                 | M                                      | M                                     | M                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>Ech011</b>      | 3                          | M                                     | M                                 | M                                      | 2                                     | 3                                     | M                                  | 2                                | M  |
| <b>Ech020</b>      | 3                          | 2                                     | M                                 | M                                      | M                                     | M                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>Ech030</b>      | 2                          | M                                     | M                                 | M                                      | 5                                     | 3                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>Ech036</b>      | 4                          | M                                     | M                                 | M                                      | M                                     | M                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>Man27</b>       | 3                          | 2                                     | M                                 | M                                      | 3                                     | 3                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>Man47</b>       | 2                          | M                                     | M                                 | M                                      | 2                                     | 2                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>Pygantarc29</b> | 2                          | M                                     | M                                 | M                                      | M                                     | M                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>Emm2</b>        | 2                          | M                                     | M                                 | M                                      | M                                     | M                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>Emm8</b>        | 2                          | M                                     | M                                 | 2                                      | M                                     | M                                     | 2                                  | M                                | M  |
| <b>Em5</b>         | 3                          | NT                                    | M                                 | M                                      | M                                     | M                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>Em23</b>        | 3                          | NT                                    | M                                 | M                                      | 7                                     | 4                                     | M                                  | 2                                | M  |
| <b>Sh2Ca12</b>     | 2                          | M                                     | M                                 | M                                      | M                                     | M                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>Sh2Ca58</b>     | 3                          | M                                     | M                                 | M                                      | M                                     | M                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>TG01-077</b>    | 3                          | M                                     | M                                 | M                                      | M                                     | M                                     | M                                  | M                                | M  |
| <b>TG01-148</b>    | 3                          | M                                     | M                                 | M                                      | M                                     | 2                                     | M                                  | 2                                | M  |
| <b>TG04-061</b>    | 3                          | M                                     | 6                                 | M                                      | 4                                     | M                                     | M                                  | 3                                | M  |
| <b>TG11-011</b>    | 3                          | M                                     | 2                                 | 3                                      | M                                     | M                                     | 3                                  | M                                | M  |
| <b>CAM-05</b>      | 9                          | M                                     | M                                 | 5                                      | M                                     | M                                     | M                                  | 2                                | M  |
| <b>CAM-11</b>      | 2                          | 5                                     | 5                                 | 2                                      | 3                                     | 2                                     | M                                  | 3                                | M  |
| <b>CAM-24</b>      | 2                          | M                                     | 5                                 | 2                                      | 4                                     | 6                                     | 3                                  | M                                | 2  |

Z tabulky č. 10 lze odečíst, že žádný z polymorfních lokusů získaných *cross-species* PCR amplifikací u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila nebyl polymorfní u všech devíti testovaných druhů vodních ptáků. Nejúspěšnějšími mikrosatelitními lokusy byly CAM-11 a CAM-24, které poskytly polymorfní produkt



u sedmi z devíti testovaných druhů. Pět lokusů (Ech011, Man27, Em23, TG01-061 a TG11-011) poskytlo polymorfní produkt u čtyř z devíti testovaných druhů. Všechny zbylé mikrosatelitní lokusy byly polymorfní u méně než čtyř z devíti testovaných druhů. Lokusy Ech036, Emm2, Em5, Sh2Ca12, Sh2Ca58 a TG01-077 vykazovaly polymorfismus pouze u čápa simbila, u ostatních druhů z kladu Aequorlornithes poskytly monomorfní produkt. Nejúspěšnější *cross-species* PCR amplifikace pomocí mikrosatelitů od devíti druhů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů byla provedena Kremlovou (2019) u pelikána bílého, a to s úspěšností 19,65 %.

U čápa simbila bylo v rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci doposud testováno ve čtyřech pracích (Nevimová, 2012, Novosadová, 2012, Fišerová, 2014 a tato práce) celkem 580 mikrosatelitních lokusů, 71 z nich poskytlo polymorfní produkt. 520 testovaných mikrosatelitních lokusů pocházelo od zástupců z kladu Aequorlornithes z řádů brodiví, potápky, potáplice, dlouhokřídlí, tučňáci, vrubozobí, veslonoží a plameňáci. Zbýlých 60 mikrosatelitních lokusů pocházelo z univerzálních ptačích mikrosatelitů. Úspěšnost zisku polymorfních mikrosatelitních lokusů činila 14,2 %.

Vienna *et al.* (2017) popsali ve své práci dalších 34 párů primerů pro tři druhy tučňáků (t. kroužkový, t. oslí a t. uzdičkový), které nebyly do této doby v Laboratoři populační genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci testovány. Do budoucna proto navrhuji tyto páry primerů na šesti nepříbuzných jedincích čápa simbila otestovat. Dále bych doporučila provést *cross-species* PCR amplifikaci všech 71 polymorfních mikrosatelitních lokusů a následnou genotypizaci u většího počtu nepříbuzných jedinců čápa simbila, aby byla získaná data kvalitnější a vhodná například k populačním studiím čápa simbila.

## 7 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala *cross-species* PCR amplifikaci genomické DNA u šesti nepříbuzných jedinců čápa simbila (*Ciconia abdimii*) s cílem nalézt polymorfní mikrosatelitní lokusy.

Použila jsem celkem 173 párů primerů, z toho bylo 113 párů primerů navržených pro devět druhů z řádu tučňáci (tučňák žlutorohý, t. žlutooký, t. nejmenší, t. kroužkový, t. uzdičkový, t. Humboldtův, t. magellanský, t. galapážský a t. brýlový). Ze zbylých 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů bylo 36 párů primerů navrženo pro 35 EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity.

Ze všech 173 testovaných mikrosatelitních párů primerů jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace získala 21 polymorfních mikrosatelitů, 146 monomorfních mikrosatelitů a u šesti mikrosatelitů se mi opakovaně nepodařilo amplifikovat žádný produkt. Celková úspěšnost pro amplifikaci mikrosatelitů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů u čápa simbila činila 12,14 %. 14 polymorfních mikrosatelitů bylo původně navrženo pro pět druhů z řádu tučňáci (tučňák žlutorohý, t. žlutooký, t. uzdičkový, t. nejmenší a t. Humboldtův). Úspěšnost amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci byla u čápa simbila 12,39 %. Dále byly polymorfní čtyři EST ptačí mikrosatelity a tři konzervované ptačí mikrosatelity. Úspěšnost amplifikace univerzálních ptačích mikrosatelitů u čápa simbila činila 11,66 %.

Po následné optimalizaci podmínek *cross-species* PCR amplifikace u čápa simbila byla teplota *annealingu* polymorfních mikrosatelitních lokusů stanovena na 48–69 °C a délka elektroforetické separace na 90–180 minut. Pro 21 mnou získaných polymorfních mikrosatelitních lokusů byl zjištěný počet alel od dvou do devíti.

## 8 Literatura

- Adámková, V. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská 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.
- Akst, E., Boersma, P., Fleischer, R. (2002): A comparison of genetic diversity between the Galapagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3, 375–383.
- Anmarkrud, J. A., Kleven, O., Bachmann, L., Lifjeld, J. T. (2008): Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evolutionary Biology* 8, 138.
- 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.
- 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.
- Brown, L. H., Urban, E. K., Newman, K. (1982): *The birds of Africa, Volume I*. Academic Press Limited, London.
- Burnie, D. (Ed.) (2002): *Zvíře*. Knižní Klub, Praha.
- Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I. R. K., Horsburgh, G. J., et 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., et 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.

del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): *Handbook of the birds of the world. Volume 1. Ostrich to Ducks.* Lynx Editions, Barcelona.

Faircloth, B. C. (2008): MSATCOMMANDER: Detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, 8, 92–94.

Filipová, K. (2016): *Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u potápky roháče (Podiceps cristatus).* Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Fišerová, E. (2014): *Analýza a charakteristika polymorfních cross-species mikrosatelitů u čápa bílého (Ciconia ciconia), černého (C. nigra) a simbila (C. abdimii).* Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Gaisler, J., Zima, J. (2007): *Zoologie obratlovců.* Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.

Gaisler, J., Zima, J. (2018): *Zoologie obratlovců. 3., přepracované vydání.* Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.

Gill, F., Donsker, D., Rasmussen, P. 2020): *IOC World Bird List (v10.1)* [navštíveno 14. 7. 2020] Dostupné z: <https://www.worldbirdnames.org/bow/storks/>

Gosler, A. (1994): *Atlas ptáků světa, České vydání 1. Příroda,* Bratislava.

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., 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, 1763–1767.

Hudec, K., Hanzák, J. (1974): Světem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci. Druhé přepracované vydání. Albatros, Praha.

Janušová, D. (2017): Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorornithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

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.

Klaczlová, M. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Kopečná, K. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Kremlová, H. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Kuramoto, T., Nishihara, H., Watanabe, M., & Okada, N. (2015): Determining the Position of Storks on the Phylogenetic Tree of Waterbirds by Retroposon Insertion Analysis. *Genome Biology and Evolution*, 7, 3180–3189.

Labuschagne, C., van Wyk, A. M., Kotzé, A., Grobler, P., Dalton, D. L. (2013): Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). *Conservation Genetics Resources*, 5, 169–171.

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.

Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294–307.

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.

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.

Roeder, A. D., Marshall, R. K., Mitchelson, A. J., Visagathilagar, T., Ritchie, P. A., Love, D. R., Pakai, T. J., McPartlan, H. C., Murray, N. D., Robinson, N. A., Kerry, K. R. Lambert, D. M. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10, 1645–1656.

Rozen, S., Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S., Krawetz S. A. (Eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 132, 365–386.

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

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.

Sibley, C. G., Ahlquist, J. E. Monroe, B. L. (1988): A Classification of the Living Birds of the World Based on DNA-DNA Hybridization Studies. *The Auk*, 105, 409–423.

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

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

Šťastný, K., Hudec, K. (2016): Fauna ČR, Ptáci 1. Academia, Praha.

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.

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

Veselovský, Z. (2001): Obecná ornitologie. Academia, Praha.

Vianna, J. A., Noll, D., Mura-Jornet, I., González- Acuña, D., Navarro, C., Loyola, D. E., Dantas, G. P. M. (2017): Comparative genome-wide polymorphic microsatellite markers in Antarctic penguins through next generation sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, 40, 676–687.

Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, J. (2004): Genetické metody v zoologii. Karolinum, Praha.

Zlochová, A. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.