

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2021**

**Petra Krňávková**

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



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí  
u čápa bílého  
(*Ciconia ciconia*)**

**Bakalářská práce**

**Petra Krňávková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2021**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Petra KRŇÁVKOVÁ  
Osobní číslo: R18649  
Studijní program: B1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého (*Ciconia ciconia*)  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. Vypracování řešerše na téma bakalářské práce.
  2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
  3. PCR amplifikace DNA čápa bílého s využitím *cross-species* primerů pro mikrosatelity, které jsou známé u ptáků z řádu trubkonosí.
- 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. Moodley, Y. *et al.* (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046-1058.
3. Kennedy, M. *et al.* (2013): The phylogenetic relationships of the extant pelicans inferred from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 215-222.
4. Bicknell, A.W.J. *et al.* (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's storm-petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). *Conservation Genetics Resources*, 3, 711-716.
5. Briedl, J. *et al.* (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913-915.

Vedoucí bakalářské práce:

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

Datum zadání bakalářské práce: 14. července 2020

Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

---

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



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Slechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holiče  
tel.: +420 585 634 901

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

## Bibliografické údaje

<b>Jméno a příjmení autora:</b>	Petra Krňávková
<b>Název práce:</b>	<i>Cross-species</i> amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u čápa bílého ( <i>Ciconia ciconia</i> )
<b>Typ práce:</b>	Bakalářská
<b>Pracoviště:</b>	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
<b>Vedoucí práce:</b>	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce:</b>	2021

### Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá hledáním polymorfních mikrosatelitních lokusů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace.

Teoretická část se věnuje fylogenezi a charakteristice řádu brodiví a čeledi čápovití, dále popisu čápa bílého, jeho rozšíření a rozmnožování. V další kapitole jsou charakterizovány mikrosatelity a v neposlední řadě jednotlivé polymorfní mikrosatelity u druhů z řádu trubkonosí, které byly *cross-species* PCR testovány u čápa bílého.

Experimentální část se zaobírá *cross-species* PCR amplifikací s použitím 213 párů primerů, kdy 207 pocházelo od zástupců z řádu trubkonosí, 5 od zástupců z řádu dlouhokřídla a 1 z řádu pěvci. Tyto mikrosatelitní lokusy byly testovány na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého. Pomocí *cross-species* PCR amplifikace jsem našla 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů s počtem alel od dvou do šesti. Mikrosatelitní lokus Paequ2 neposkytl žádný produkt. Zbývajících 194 lokusů poskytlo produkt monomorfní.

<b>Klíčová slova:</b>	Čáp bílý, mikrosatelity, <i>cross-species</i> PCR amplifikace, <i>Ciconia ciconia</i> , trubkonosí
<b>Počet stran:</b>	59
<b>Počet příloh:</b>	0
<b>Jazyk:</b>	Český

## **Bibliographical identification**

**Author's name and surname:** Petra Krňávková

**Title:** Cross-species amplification of microsatellites from Procellariiformes in White Stork (*Ciconia ciconia*)

**Type of thesis:** Bachelor

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

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

**The year of presentation:** 2021

### **Summary:**

This bachelor thesis deals with the search for polymorphic microsatellite loci in white storks (*Ciconia ciconia*) using cross-species PCR amplification.

The theoretical part deals with the phylogeny and characteristics of the order of Ciconiiformes and family Ciconiidae, further there is a description of the white stork, its distribution and reproduction. The next chapter characterizes microsatellites and polymorphic microsatellites in species from the order of the Procellariiformes, which were cross-species PCR tested in white storks.

The experimental part deals with cross-species PCR amplification using 213 pairs of primers, 207 of which were from species of the order Procellariiformes, 5 from species of the order Charadriiformes and 1 from the order Passeriformes. These microsatellites were tested on the genomic DNA of 6 unrelated white storks individuals. Using cross-species PCR amplification, I found 18 polymorphic microsatellite loci with number of alleles ranged from 2 to 6. Microsatellite loci Paequ2 did not amplified product. The remaining 194 loci gave the product monomorphic.

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

**Number of pages:** 59

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. a za použití citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci dne 30. 7. 2021

.....

Tímto bych ráda chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za veškerou pomoc, ochotu, poskytnuté materiály, věnovaný čas a odborné vedení při zpracování teoretické, a především experimentální části mé bakalářské práce.



## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled</b> .....	<b>3</b>
3.1	Fylogeneze a systematika řádu Ciconiiformes.....	3
3.2	Charakteristika řádu brodiví.....	5
3.3	Čeď čápoovití.....	5
3.4	Čáp bílý .....	7
3.4.1	Rozšíření a migrace čápa bílého .....	8
3.4.2	Hnízdění, rozmnožování a péče o mláďata.....	9
3.5	Mikrosatelity .....	10
3.6	Mikrosatelity druhů z řádu trubkonosí.....	12
3.6.1	Mikrosatelity od druhů z čeledi albatrosovití .....	12
3.6.2	Mikrosatelity od druhů z čeledi buňňákovití.....	14
3.6.3	Mikrosatelity od druhů z čeledi buňňáčkovití.....	18
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>20</b>
4.1	Biologický materiál.....	20
4.2	Seznam použitých chemikálií .....	20
4.3	Seznam použitých roztoků .....	21
4.4	Seznam použitých laboratorních přístrojů .....	22
4.5	PCR amplifikace DNA čápa bílého .....	23
4.6	Amplifikované mikrosatelitní lokusy u čápa bílého .....	24
4.7	Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace .....	26
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>44</b>

## Seznam obrázků

<b>Obrázek č. 1:</b> Zařazení čeledi Ciconiidae dle Kuramoto <i>et al.</i> (2015). .....	4
<b>Obrázek č. 2:</b> Rozdělení druhů v čeledi čápoovití podle Sheldon <i>et Slikas</i> (1997) a Slikas (1998).....	7
<b>Obrázek č. 3:</b> Přehled 18 mikrosatelitních lokusů, které byly polymorfní u čápa bílého vzhledem ke zdrojovým druhům. ....	32
<b>Obrázek č. 4:</b> Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Ptero02 u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého. ....	34
<b>Obrázek č. 5:</b> Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Oc87B u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého. ....	34
<b>Obrázek č. 6:</b> Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Ptero09 u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého. ....	34
<b>Obrázek č. 7:</b> Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Pc D103 u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého. . ....	35

## Seznam tabulek

<b>Tabulka č. 1:</b> Složení PCR směsi pro 6 vzorků.....	23
<b>Tabulka č. 2:</b> Seznam mikrosatelitů od druhů z čeledi albatrosovití testovaných na polymorfismus u čápa bílého.....	24
<b>Tabulka č. 3:</b> Seznam mikrosatelitů od druhů z čeledi buňňákovití testovaných na polymorfismus u čápa bílého.....	25
<b>Tabulka č. 4:</b> Seznam mikrosatelitů od druhů z čeledi buňňáčkovití testovaných na polymorfismus u čápa bílého.....	26
<b>Tabulka č. 5:</b> Seznam mikrosatelitů od druhů z řádu dlouhokřídlí a pěvci testovaných na polymorfismus u čápa bílého.....	26
<b>Tabulka č. 6:</b> Charakteristika 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů testovaných na 6 nepříbuzných jedincích čápa bílého.....	30
<b>Tabulka č. 7:</b> Genotypy 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého. ....	33
<b>Tabulka č. 8:</b> Přehled polymorfních mikrosatelitních lokusů z řádu trubkonosí u čápa bílého (tato práce) a testy u dalších vybraných druhů z kladu Aequorlitorlornithes: nesyta indomalajského (Nedvědová, 2015), plameňáka karibského (Strejčková, 2018), plameňáka růžového (Zlochová, 2019), pelikána bílého (Hudzieczková, 2019), potápky roháče (Janušová, 2017), pelikána afrického (Kopečná, 2020) a kadeřavého (Verešová, 2020). ....	41

## 1 Úvod

Mikrosatelity se někdy nazývají krátké tandemové repetice o typické délce jednotky 1–6 bp a patří mezi nejpůlárnější typy genetických markerů. Jejich velká využitelnost spočívá v tom, že jsou kodominantní, multialelické a vysoce polymorfní. Používají se hlavně při paternitních studiích a při studiu fylogenetické příbuznosti jedinců.

Čáp bílý je typickým zástupcem řádu brodiví. Je to zranitelný druh, který je po desítky let sledován ornitology a v laboratoři Populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci se již několik lidí věnovalo hledáním mikrosatelitů u tohoto druhu. Má bakalářská práce by měla najít další nové polymorfní mikrosatelity od zástupců z řádu trubkonosí pro čápa bílého.

## 2 Cíle práce

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

### 3 Literární přehled

#### 3.1 Fylogeneze a systematika řádu Ciconiiformes

Recentní ptáky lze rozdělit na dvě základní podtřídy, a to na běžce (Palaeognathae) a na letce (Neognathae). Letci se dále dělí na dva sesterské klady, první je Galloanserae kam se řadí hrabaví (Galliformes) a vrubozobí (Anseriformes) a druhý sesterský klad je Neoaves, kam se řadí zbývající ptáci a kam patří většina vodních ptáků (Cracraft *et al.*, 2004). Mezi vodní ptáky se řadí brodiví (Ciconiiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), potáplice (Gaviiformes), trubkonosí (Procellariiformes), tučňáci (Sphenisciformes), veslonozí (Pelecaniformes) a také vrubozobí (Anseriformes) (Sibley *et Alhquist*, 1988; Gibb *et al.*, 2013; Wang *et Clarke*, 2014). Pojetí fylogeneze vodních ptáků prošlo historickým vývojem a bylo studováno mnoha autory.

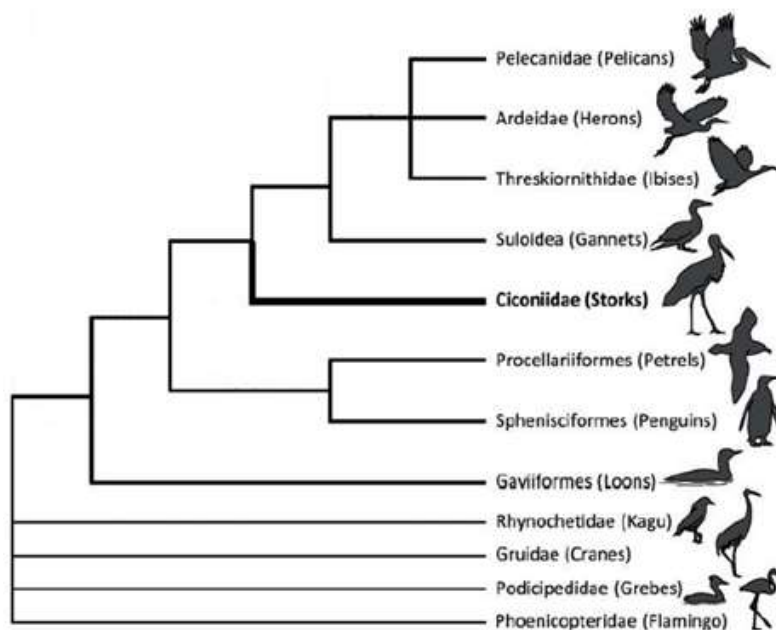
Sibley *et Alhquist* (1988) studovali fylogenezi ptáků na základě DNA-DNA hybridizace. Zahrnuli veslonohé a brodivé společně do jedné parafyletické skupiny a spojovali je se skupinami jako jsou tučňáci, potápky a albatrosi. Navrhli, že čápoovití včetně kondorů jsou sesterskou skupinou pelikánovitých (Pelecanidae) a jejich další návrh byl, že je sesterský vztah mezi trubkonosými a tučňáky.

Podle Sheldon *et Slikas* (1997) tvoří řád brodivých (Ciconiiformes) čeledi čápoovití (Ciconiidae), ibisovití (Threskiornithidae), volavkovití (Ardeidae), plameňákovití (Phoenicopteridae), člunozobcovití (Balaenicipitidae) a kladivoušovité (Scopidae). Většina z těchto čeledí sdílí společné znaky s členy řádů veslonožých (Pelecaniformes), dlouhokřídly (Charadriiformes), krátkokřídly (Gruiformes), vrubozobých (Anseriformes) a dravců (Falconiformes), což by mohlo naznačovat fylogenetickou příbuznost (Sheldon *et Slikas*, 1997; Cracraft *et al.*, 2004). Naopak Hackett *et al.* (2008) ve své práci neprokázali žádné příbuzenství dravců k čápovitým a řády potápky a plameňáci byly prohlášeny za sesterské taxony.

S dalším zpracováním systému vodních ptáků přišli Cracraft *et al.* (2004) a na základě jejich studie a nových molekulárních dat je pravděpodobné, že řády brodiví a veslonozí nejsou monofyletické. Veslonozí v tradičním pojetí (pelikánovití, terejovití, anhingovití, kormoránovití, fregatkovití, faetonovití) jsou rozšíření o taxony, které se dříve řadily k brodivým, a to o člunozobce, kladivouše a ibisovité. Podle výsledků studie provedené Kuramoto *et al.* (2015) byla v řádu Pelecaniformes ponechána pouze čeleď

pelikánovití (Pelecanidae) a čeledi terejovití (Sulidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae), anhingovití (Anhingidae) a fregatkovití (Fregatidae) vytvořily nový řád Suliformes. Čeď faetonovití tvoří samostatný řád faetoni (Phaethontiformes).

Kuramoto *et al.* (2015) do svého studia fylogeneze zahrnuli retrotranspozony. Vytvořili systém vodních ptáků, kde základ tvoří čeledi pelikánovití, volavkovití a ibisovití, k nim je řazena jako sesterská skupina čeď terejovití, která dříve patřila do řádu Pelecaniformes a další sesterskou skupinou k této celé skupině jsou čápoovití. Na stejné úrovni jsou k této skupině promíchaných čeledí tradičních brodivých a veslonohých jako sesterská skupina řazení Procellariiformes a Sphenisciformes a k tomu všemu jsou sesterskou skupinou Gaviiformes. Výsledek jejich studie naznačuje, že je řád brodiví v tradičním pojetí polyfyletický, což je v souladu s analýzami jaderného genomu. Fylogenetická pozice čápoovitých stále nebyla stanovena ani přes použití molekulárních analýz. Nejprve byla čeď čápoovitých řazena do řádu Ciconiiformes společně s čeledí ibisovití. Relativně blízký vztah mezi čápoovitými, volavkovitými a ibisovitými je zatím postaven na morfologických datech a srovnáních sekvencí mitochondriální DNA. Co se týče čápů, díky této studii bylo navrženo, že někteří ptáci např. kondoři, tučňáci a plameňáci mohou být jejich sesterskou skupinou (Kuramoto *et al.*, 2015). Aktuálně jsou vztahy mezi skupinami tradičně pojatých Pelecaniformes a Ciconiiformes stále studovány a je otázkou jaké změny přinese další výzkum.



**Obrázek č. 1:** Zařazení čeledi Ciconiidae dle Kuramoto *et al.* (2015).

Prum *et al.* (2015) se zabývali fylogenezí skupiny Neoaves, do níž zařadili 5 hlavních kladů a to Strisores, Columbaves, Gruiformes, Inopinaves a Aequirornithes. Aequirornithes je nový komplexní klad vodních ptáků s výjimkou vrubozobých. Rozděluje je na dvě části, kdy do první řadí tučňáky, trubkonosé, potáplice, brodivé, veslonohé a dlouhokřídlé. V druhé části jsou potápky a plameňáci, kteří jsou jejich sesterskou skupinou.

V posledních několika letech dochází ke změně tradičního pojetí řádu Ciconiiformes, do něhož se řadili čápovití (Ciconiidae), volavkovití (Ardeidae), ibisovití (Threskiornithidae), člunozobcovití (Balaenicipitidae) a kladivoušovití (Scopidae). V současné době tvoří řád Ciconiiformes jediná čeleď, a to čápovití a ostatní čeledě, které dříve tvořily řád brodivých jsou nově řazeny do řádu Pelecaniformes s čeledí pelikánovití (Pelecanidae) (Gill *et* Donsker, 2021).

### 3.2 Charakteristika řádu brodiví

Brodiví (Ciconiiformes) v novém pojetí jsou skupinou středně velkých až velkých ptáků, kteří jsou typičtí svými dlouhými nohama, krkem a zobákem. Zástupci tohoto řádu obývají s výjimkou Antarktidy a severních oblastí Ameriky, Evropy a Asie všechny kontinenty (Hanzák *et* Hudec, 1963). Jejich dlouhé nohy jim slouží pro brodění v mělkých vodách, kde si také obstarávají potravu. Jako potrava jim slouží ryby, obojživelníci, měkkýši a krabi. Jsou vázáni na sladké vody a jejich okolí. Na nohou mají čtyři prsty, které jsou od sebe oddáleny, tři prsty směřují dopředu a jeden dozadu, díky tomu se jejich hmotnost při chůzi v blátě nebo v mokřinách rozloží do větší plochy. Mezi prsty nemají plovací blánu (Svensson *et* Grant, 2004). Všechny druhy patřící do tohoto řádu mají široká křídla. Při letu mají natažený krk. Mají ostrý zrak, který hlavně využívají k hledání potravy a jakmile zaregistrují kořist, okamžitě zaútočí svým dlouhým zobákem a kořist polapí. Ne všichni loví živou kořist, například čáp marabu je nekrofág, tudíž se živí mrtvými těly jiných živočichů (Burnie, 2009).

### 3.3 Čeleď čápovití

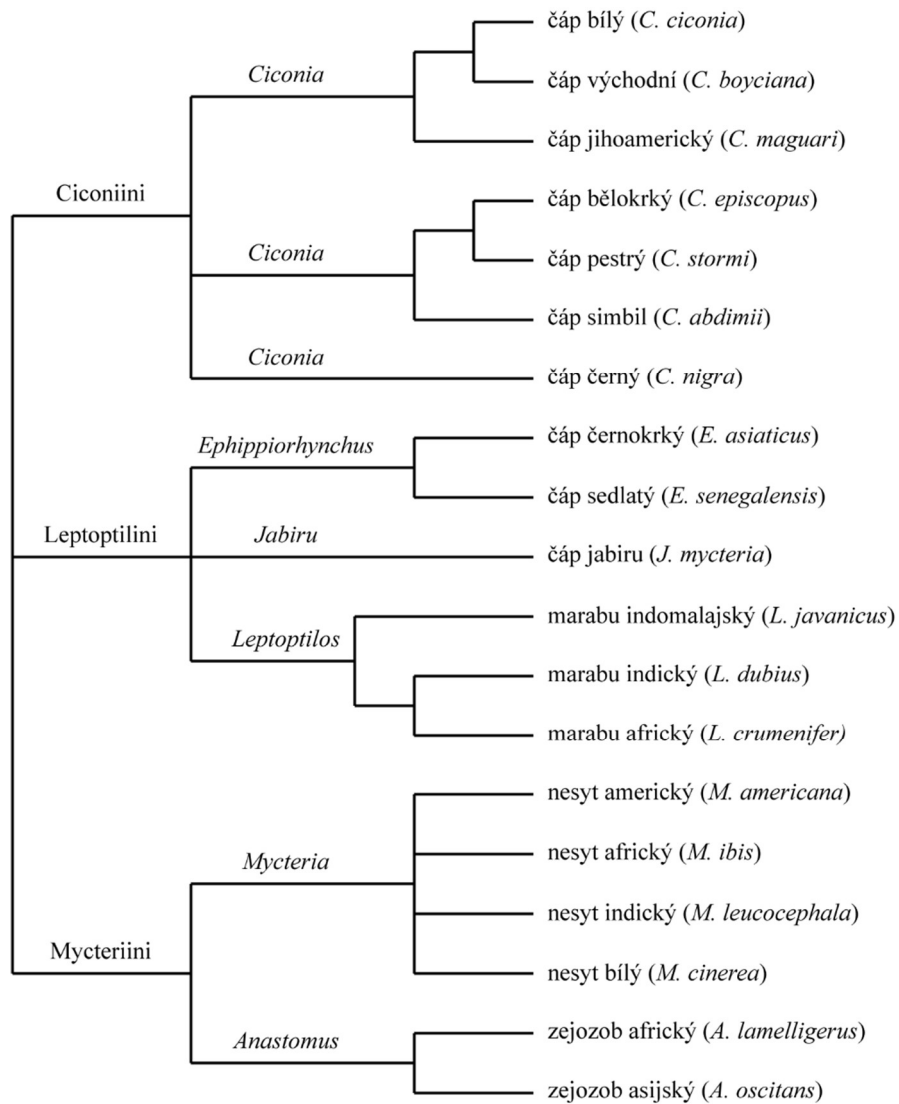
Čeleď čápovití (Ciconiidae) zahrnuje 19 recentních druhů, které jsou rozšířené na všech kontinentech s výjimkou chladných oblastí. Na základě studií provedených Slikasem (1997) je silně podporovaná monofylie čeledi.

Čápovití mají mohutné tělo a dlouhé nohy se čtyřmi prsty. Mají typický dlouhý krk se silným, klínovitým a na špičce ze stran zploštělým zobákem. U některých druhů



se zobák uprostřed nedovírá. Kromě syčení nevydávají žádný hlasový projev, někteří z nich mohou klapat zobákem (Gaisler *et* Zima, 2018). Hnízda si stavějí na skalách, ale také na stromech z rákosí a někteří z nich si zvykli na člověka, a proto si stavějí hnízda i na lidských obydlích a jejich okolí. Jsou to všežravci, kteří se živí hlavně živočišnou potravou, kterou loví při chůzi v mělké vodě nebo na souši (Hanzák *et* Hudec, 1963).

Čeleď čápovití zahrnuje triby Ciconiini, Leptoptilini a Mycteriini. Do prvního tribu patří pouze rod *Ciconia* se 7 druhy, a to čáp bělokrký (*C. episcopus*), bílý (*C. ciconia*), černý (*C. nigra*), jihoamerický (*C. maguari*), pestrý (*C. stormi*), simbil (*C. abdimii*) a východní (*C. boyciana*). Druhý tribus zahrnuje 3 rody se 6 druhy a to *Ephippiorhynchus*, do kterého patří čáp černokrký (*E. asiaticus*) a sedlatý (*E. senegalensis*), rod *Jabiru* s čápem jabiru (*J. mycteria*), rod marabu (*Leptoptilos*) s marabu africkým (*L. crumenifer*), indickým (*L. dubius*) a indomalajským (*L. javanicus*). Poslední tribus je tvořen 2 rody se 6 druhy, prvním rodem je nesyť (*Mycteria*), kam se řadí nesyť africký (*M. ibis*), americký (*M. americana*), bílý (*M. cinerea*) a indický (*M. leucocephala*) a druhým rodem je zejzob (*Anastomus*) se zejzobem africkým (*A. lamelligerus*) a asijským (*A. oscitans*) (viz Obrázek č. 2) (Gill *et* Donsker, 2021).



**Obrázek č. 2:** Rozdělení druhů v čeledi čápovití podle Sheldon *et* Slikas (1997) a Slikas (1998).

### 3.4 Čáp bílý

Systematické zařazení čápa bílého (*Ciconia ciconia*) je dle Gaisler *et* Zima (2018) následující:

- Říše: Animalia - živočichové
- Kmen: Chordata - strunatci
- Podkmen: Vertebrata - obratlovci
- Třída: Aves - ptáci
- Podtřída: Neognathae - letci
- Řád: Ciconiiformes - brodiví
- Čeleď: Ciconiidae - čápovití

Rod: *Ciconia* - čáp

Druh: *Ciconia ciconia* - čáp bílý

Čáp bílý má délku těla 95–110 cm. Hmotnost je přibližně 2,5 kg (Burnie, 2009). Rozpětí křídel je okolo dvou metrů. Je to velký pták, s dlouhým krkem a nohama a krátkým ocasem. Na zemi je nezeměnitelný, ale za letu je možné si ho splést s pelikánem bílým (Svensson *et* Grant, 2004).

Jeho barva je bílá, pouze letky má černé a nohy a zobák jsou červené (Anděra, 2003). Mladí čápi mají zobák i nohy černé (Hanzák, 1974). Podle zbarvení od sebe nelze rozeznat samici od samce, ale samec je většinou o trochu větší (Hanzák *et* Hudec, 1963; Burnie, 2009).

Loví pomalým krokem a až když spatří kořist, rychle zaútočí svým dlouhým zobákem. Žije převážně v blízkosti mělkých vod, ve kterých se brodí, ale potravu může také lovit na souši, kde loví většinou na polích nebo loukách. Jako potrava mu slouží plazi, obojživelníci, ptáci, ale i menší savci (Veselovský, 1987). Může se živit také hmyzem.

Jeho početnost se v Evropě v minulém století výrazně snížila. Na rozdíl od Evropy, kde jsou čápi chráněni, v Africe jsou loveni (Felix, 1977). Od 90. let jeho počty rostou, a to i v České republice (Škorpíková *et al.*, 2012). Každoročně probíhá mezinárodní sčítání populace a nejvíce čápů se nachází v Polsku, Španělsku a Bělorusku (Lacina *et* Rejman, 2002).

Čáp bílý je zařazen mezi zvláště chráněné druhy a řadí se do kategorie „málo dotčený“.

### **3.4.1 Rozšíření a migrace čápa bílého**

Čáp bílý je rozšířen v Evropě, v Asii a v Africe (Anděra, 2003; Burnie, 2009). V době jeho hnízdění se nejvíce vyskytuje v Evropě, nenachází se v západní Francii, ve Velké Británii, v Itálii a také ve Skandinávii. Dále se nachází v Asii, a to v Izraeli, v Iránu, Iráku a v Zakavkazí. Hnízdí hlavně v Evropě, v severozápadní Africe (Maroko, Tunisko, Alžírsko), Malé a Střední Asii a na Dálném východě (Hanzák, 1974). V České republice a na Slovensku hnízdí většinou v oblastech bohatých na rybníky a bažiny, tudíž v jižních Čechách, na jižní Moravě a na Pardubicku (Hanzák *et* Hudec, 1963; Anděra, 2003).

Je to tažný pták, evropské populace zimují v jižní Africe, zatímco asijské čápi zimují v Indii (Svensson *et* Grant, 2004). Pomocí kroužkování čápů je možné čápy kontrolovat, aniž by se museli lovit nebo usmrtit a je možné sledovat, kam čápi táhnou. Bylo zjištěno, že ptáci ze západní Evropy letí do Afriky přes Španělsko, Gibraltar a Saharu, zatímco čápi z východní Evropy letí přes Balkán, Malou Asii a Izrael. Za jeden den urazí něco mezi 100 až 300 km (Bouchner, 1986). Při jarním návratu urazí čápi denně přibližně 150 km. Cesta do zimovišť jim zabere přibližně tři měsíce a celkově urazí přibližně 13 000 km. Důvodem, že se čápi nemusí vrátit ze svých zimovišť, jsou stepní požáry, krupobití, ale také nedostatek potravy. Nad mořem táhnou většinou ve výšce 5 až 15 metrů nad hladinou, což je pro ně také velmi nebezpečné z důvodu pádu do vody a následného utopení (Hanzák *et* Hudec, 1963).

### 3.4.2 Hnízdění, rozmnožování a péče o mláďata

Původně čáp bílý hnízdil na vysokých stromech, ale ve velké části Evropy se stal synantropním druhem, a proto dnes hnízdí spíše na lidských stavbách jako jsou komíny, střechy budov a sloupy elektrického vedení ve výškách do 45 m (Anděra, 2003). Na Balkáně stále zůstává věrný původní strategii a hnízdí na starých osamělých stromech (Hanzák *et* Hudec, 1963).

Hnízdo má v průměru až 80 cm a jeho výška je 30–40 cm, díky užívání hnízda po dobu několika let, může dosahovat v průměru až 2 m (Anděra, 2003). Po zimě se v České republice čápi začínají objevovat na začátku jara na přelomu března a dubna v závislosti na vývoji počasí v daném roce, kdy jako první přiletí samec, který hnízdo obsadí a chrání ho před cizími samci (Hanzák, 1974) a začíná s opravou starého hnízda, anebo staví hnízdo nové. Je to stavba složená z větví, hlíny, drnů, hadrů a trávy (Bouchner, 1986). Pár, který hnízdo postavil, ho většinou využívá každý rok a když má o hnízdo zájem jiný pár, může dojít i k boji, při kterém může být protivník i zabit (Felix, 1977).

Samice obvykle snáší 1–5 vajec a často v hnízdě nalézají domov i jiní ptáci, např. vrabci (Anděra, 2003). Snůška probíhá na přelomu dubna a května (Bouchner, 1986). V sezení na vejcích se střídají oba rodiče po dobu 30 až 40 dní (Felix, 1977). Po vylíhnutí nadále chrání svá mláďata před srážkami, chladem nebo případným horkem (Hanzák, 1974). Starost o mláďata trvá asi 70 dní, rodiče se střídají na hnízdě, když jeden přilétne, druhý odlétne. Pouze v noci jsou v hnízdě přítomni oba rodiče. V prvních 16 dnech se střídají asi po 2 hodinách, později to už nedodržují a samec asi po 22. až 24. dnu opouští

hnízdě, i když samice není přítomna, ta to začne praktikovat až po 30. dni (Hanzák *et* Hudec, 1963). I na krmení se podílejí oba rodiče, kdy se mláďata krmí sama, pomocí vývržků v hnízdě (Bouchner, 1986). V době hnízdění se může kromě žab žít také malými obratlovci, měkkýši nebo červy. Čápata zůstávají v hnízdě po dobu dvou měsíců. Když mají asi 70 dnů, začínají se osamostatňovat (Hanzák, 1974).

Když je nedostatek potravy, může se stát, že nejmladší mládě zeslábně a přestane přijímat potravu a v tu chvíli ho rodiče začnou považovat za cizí a vyhodí ho z hnízda, někdy ho i zkonsumují. Mláďata se učí létat v hnízdě sama, kdy kolem 60. dne podstoupí svůj první let. Mladí čápi dospívají pohlavně až kolem třetího roku života (Hanzák *et* Hudec, 1963).

### 3.5 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou někdy nazývány jako jednoduché opakující se sekvence (SSRs) nebo také jako krátké tandemové repetice (STRs) ve kterých se opakuje specifický motiv 1–6 bp (Goldstein *et* Pollock, 1997). V současné době jsou jedním z nejpopulárnějších typů genetických markerů používaných v genetických studiích, v konzervační genetice, populační genetice, ve šlechtitelství a paternitních studiích (Oliveira *et al.*, 2006; Barbará *et al.*, 2007). Tolik možností využití mikrosatelitů spočívá v tom, že jsou kodominantní a multialelické. Kromě jejich vysoké variability jsou také hojně distribuovány v eukaryotických genomech, což z nich dělá preferované markery pro genetické mapování s velmi vysokým rozlišením (Goldstein *et* Pollock, 1997). Mikrosatelity lze úspěšně použít pro genotypizaci vzorků s nízkou koncentrací nebo kvalitou DNA (Dawson *et al.*, 2013). U prokaryot jsou mikrosatelity přítomny v malém počtu. Aby byl polymorfní mikrosatelit co nejlépe informačně využitelný, měl by mít co nejvíce alel a měl by v populaci vykazovat vysokou heterozygotnost (Ellegren, 2004).

Podle typu opakování Oliveira *et al.* (2006) rozdělili mikrosatelity na dokonalé, nedokonalé, přerušované nebo složené. V dokonalém mikrosatelitu není opakovaná sekvence přerušena žádnou bází (TATATATATATATA), zatímco v nedokonalém mikrosatelitu je přítomna báze, která neodpovídá danému motivu (TATATATACTATATA). V případě přerušovaného mikrosatelitu je přítomna krátká sekvence, která neodpovídá sekvenci motivu (TATATACCTGTATATATATA) a ve složeném mikrosatelitu je mikrosatelit tvořen ze dvou různých repetitivních sekvencí (TATATATATAGTGTGTGTGTGT). Tóth *et al.* (2000) rozdělili mikrosatelity na mono-,

di-, tri-, tetra-, penta-, hexa- a polynukleotidové sekvence. Mono-, di-, tri- a tetranukleotidové repetice jsou hlavními typy mikrosatelitů. Převážná část jednoduchých opakování se nachází v nekódující DNA, buď v intergenních sekvencích nebo v intronech (Ellegren, 2004). V exonech jsou nejčastěji přítomné trinukleotidové repetice a druhé nejčastěji zastoupené jsou hexanukleotidové repetice. V intergenních oblastech a u intronů se častěji vyskytují mikrosatelity s hexanukleotidovými repeticemi než u exonů (Tóth *et al.*, 2000).

Četnost výskytu mikrosatelitů má tendenci pozitivně korelovat s velikostí genomu. Mezi eukaryotickými genomy je nejvyšší četnost mikrosatelitů u savců. V rostlinách četnost výskytu mikrosatelitů negativně koreluje s velikostí genomu. (Ellegren, 2004).

Rychlost mutace mikrosatelitů je mnohem vyšší než v jiných částech genomu a je v rozmezí  $10^{-2}$ – $10^{-6}$  nukleotidů na jeden lokus na jednu generaci (Sia *et al.*, 2000). Důvodem vysoké rychlosti mutace jsou chyby během rekombinace, nerovnoměrný crossing-over a sklouznutí polymerázy během replikace nebo opravy DNA (Strand *et al.*, 1993). Neexistuje jednotná rychlost mutace mikrosatelitů, rychlost se liší mezi lokusy a mezi alelami. Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím rychlost mutace je délka mikrosatelitu, kdy se rychlost mutace zvyšuje se zvyšujícím se počtem opakujících se jednotek (Ellegren, 2004).

Vývoj specifických mikrosatelitních primerů je velmi nákladný, nicméně se ukázalo, že páry primerů, které jsou určeny pro jeden druh, lze použít i pro jiné druhy stejného rodu a tato vlastnost mikrosatelitů je známá jako *cross-species* PCR amplifikace. *Cross-species* PCR amplifikace může být velmi důležitým faktorem při usnadnění využití mikrosatelitů, protože snižuje pracnost, zkracuje čas hledání mikrosatelitů a zlevňuje náklady při práci. Úspěšná převoditelnost primerů pro amplifikaci mikrosatelitů klesá s fylogenetickou vzdáleností druhů. Ve srovnání s jinými skupinami markerů (AFLP, RFLP, RAPD) jsou mikrosatelity vysoce polymorfní (Oliveira *et al.*, 2006).

Mikrosatelitní lokusy jsou mnohem méně hojné u ptáků než u některých jiných tříd živočichů, jako jsou savci a ryby (Neff *et al.* 2001), praktické výhody *cross-species* PCR amplifikace jsou u ptáků pravděpodobně nejdůležitější. Studie na ptácích proto běžně používají protokoly obohacování k izolaci dostatečného množství

mikrosatelitních lokusů (Dawson *et al.*, 2010). U ptáků se mikrosatelity používají především pro analýzu rodičovství (Dawson *et al.*, 1997).

### 3.6 Mikrosatelity druhů z řádu trubkonosí

Řád trubkonosí se dělí do čtyř čeledí, a to na albatrosovité (Diomedidae), buňňákovité (Procellariidae), buňňáčkovité (Hydrobatidae) a buňňíkovité (Pelecanoididae). Laboratoř populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci disponuje celkově 207 páry primerů od druhů z řádu trubkonosí. Z čeledi albatrosovití to je 53 mikrosatelitů od 7 druhů. Z čeledi buňňákovití 100 mikrosatelitů, které jsou popsány u 9 druhů. V rámci buňňáčkovitých to je 54 mikrosatelitů od 3 druhů. Od zástupců z čeledi buňňíkovití Laboratoř populační genetiky nedisponuje žádnými mikrosatelity. Dalších 6 mikrosatelitů, které byly úspěšně použity u druhů z řádu trubkonosí jako *cross-species* pocházelo od druhů z řádu dlouhokřídílí (Charadriiformes) od alkouna obecného (*Cephus grylle*), kulíka mořského (*Charadrius alexandrinus*) a racka novozélandského (*Chroicocephalus novaehollandiae scopulinus*) a 1 mikrosatelit z řádu pěvci (Passeriformes) od lesňáčka žlutohého (*Dendroica petechia*).

#### 3.6.1 Mikrosatelity od druhů z čeledi albatrosovití

Z čeledi albatrosovití disponuje laboratoř 53 mikrosatelity, které byly popsány v 5 článcích a izolovány od 7 druhů - albatrose stěhovavého (*Diomedea exulans*), jižního (*D. antipodensis*), šedohlavého (*Thalassarche chrysostoma*), černobrvého (*T. melanophris*), bělohřbetého (*Phoebastria albatrus*), černonohého (*P. nigripes*) a laysanského (*P. immutabilis*).

Burg (1999) charakterizovala 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly izolovány ze dvou druhů, a to od albatrose šedohlavého a albatrose stěhovavého. Genomická DNA byla štěpena restriční endonukleázou a vybrané fragmenty o velikosti 300–800 bp byly ligovány do plazmidu a poté byly transformovány do *E. coli*. Pomocí sondy (AC)<sub>15</sub> byly vybrány fragmenty s repeticemi a byla zkonstruovaná knihovna. Primery byly navrženy z 31 mikrosatelitních sekvencí a z nich vybrali 26, které poskytly PCR produkt. *Cross-species* PCR amplifikace byla prováděna s použitím DNA z albatrose šedohlavého, černobrvého a stěhovavého. 21 lokusů bylo polymorfních u jednoho nebo více druhů a úroveň polymorfismu byla v rozmezí 2–11 alel. Pouze dva

lokusy (Dc10 a Dc19) se nepodařilo amplifikovat u albatrose stěhovavého, ale byly úspěšně amplifikovány u dalších dvou druhů.

Burg *et* Croxall (2001) zkoumali strukturu populace černobrvých, campbellských a šedohlavých albatrosů pomocí mtDNA a mikrosatelitních analýz. Vzorky krve byly odebrány od albatrosů žijících na šesti různých ostrovech v Jižním oceánu a genomická DNA byla izolována z krve modifikovanou extrakcí pomocí Chelexu. Z 37 lokusů, které byly izolovány z albatrosů, bylo použito sedm, které již dříve popsala Burg (1999). Těchto sedm mikrosatelitových lokusů obsahovalo 4–13 alel u albatrosů černobrvých a 5–12 alel u albatrosů šedohlavých. Navíc použili nový mikrosatelitní lokus De35, pro který bylo nalezeno u albatrose černobrvého 12 alel a u albatrose šedohlavého 22 alel.

Burg *et* Croxall (2004) se zabývali taxonomií a fylogenetickými vztahy vybraných druhů albatrosů. Využili mtDNA a 9 mikrosatelitních lokusů u čtyř druhů (albatros jižní, stěhovavý, Gibsonův a tristanský). Krevní vzorky byly získány z dospělých albatrosů stěhovavých žijících na sedmi ostrovech v oblasti Jižního oceánu. Genomická DNA byla izolována z krve. Celkem 772 vzorků bylo genotypováno na 9 mikrosatelitních lokusech-De3, De5, De11, Dc16, De18, Dc20, Dc27 a De33, které byly už dříve popsány Burg (1999) a nově De37, který vykazoval u všech druhů polymorfismus se 6 a 7 alelami. Bylo zjištěno, že De33 je pohlavně vázaný a autoři jej pro další analýzu nepoužili.

Dubois *et al.* (2005) popsali 10 variabilních dinukleotidových mikrosatelitů u albatrose stěhovavého. DNA byla extrahovaná z krevních vzorků. Celkově bylo testováno 1248 klonů, z nichž 254 poskytlo pozitivní signál. 15 lokusů s největším počtem nepřetržitě opakujících se sekvencí bylo použito pro další amplifikaci. Jejich variabilita byla hodnocena u tří populací z Crozetových ostrovů a souostroví Kergueleny. Deset z 15 lokusů bylo polymorfních, se 2–13 alelami. *Cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů albatrose stěhovavého byla provedena u 5 jedinců, ze tří dalších druhů trubkonosých, a to u buřňáka Bulwerova, šedého a sněžného. U buřňáka Bulwerova a sněžného se amplifikovalo 8 mikrosatelitů a lokusy 6F12 a 7D18 se neamplifikovaly vůbec. U buřňáka Bulwerova vykazovalo polymorfismus 5 lokusů a buřňáka sněžného 3 lokusy. U buřňáka šedého byly všechny lokusy monomorfní. Počet alel u polymorfních lokusů autoři nevedli.

Hernandez *et al.* (2014) popsali 15 polymorfních mikrosatelitních lokusů u tří druhů, a to u albatrose černonohého, bělohřbetého a laysanského. Genomická DNA byla



extrahována ze svalové tkáně 36 jedinců albatrose černonohého, 12 jedinců albatrose laysanského a 3 jedinců albatrose bělohřbetého a byly sestaveny genomové knihovny. Testováním 16 párů primerů bylo 13 polymorfních lokusů s 2–18 alelami u albatrose černonohého i laysanského a 14 polymorfních lokusů s 2–7 alelami u albatrose bělohřbetého.

### 3.6.2 Mikrosatelity od druhů z čeledi buřňákovití

Z čeledi buřňákovití laboratoř disponuje 100 polymorfními mikrosatelity, které byly popsány v 10 člancích a byly izolovány od 9 druhů - buřňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), šedého (*Calonectris diomedea*), taiko (*Pterodroma magentae*), trinidadského (*P. arminjoniana*), havajského (*P. sandwichensis*), baleárského (*Puffinus mauretanicus*), světlonohého (*P. carneipes*) Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) a útlozobého (*Pachyptila belcheri*).

Techow *et* O’Ryan (2004) izolovali a charakterizovali šest polymorfních dinukleotidových mikrosatelitních lokusů od buřňáka bělobradého. Z tkáně odebrané z buřňáka bělobradého byla DNA izolována pomocí fenol-chloroformové metody a následného srážení s ethanolem. Byla sestrojena genomová knihovna, která byla obohacena o fragmenty DNA, které měly (CA)<sub>n</sub> repetitivní sekvence. Z 21 sekvenovaných rekombinantních plazmidů, 17 obsahovalo mikrosatelity. Pro 10 mikrosatelitů byly navrženy primery. Variabilita byla hodnocena u 68 jedinců buřňáka bělobradého, kdy 6 lokusů bylo polymorfních a obsahovalo 3–9 alel. Tyto mikrosatelity byly následně testovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace u buřňáka tristanského, obrovského a Hallova, albatrose stěhovavého, šedohlavého a černobrvého. Lokus Paequ2 se podařilo amplifikovat u všech druhů a byl polymorfní u buřňáka tristanského a u albatrose šedohlavého a černobrvého. Paequ3 a Paequ10 vykazovaly polymorfismus u všech druhů s výjimkou albatrose stěhovavého, zde se nepodařila amplifikace vůbec. Paequ4 byl polymorfní u buřňáka obrovského a Hallova. Paequ7 byl polymorfní u buřňáka tristanského a obrovského. Paequ8 vykazoval polymorfismus u buřňáka tristanského a albatrose šedohlavého. A poslední Paequ13 se podařilo amplifikovat u tří druhů, a to u buřňáka tristanského, albatrose stěhovavého a albatrose šedohlavého, kde ve všech případech byl polymorfní.

Lawrence (2008) našla dva polymorfní mikrosatelitní lokusy u buřňáka taiko. DNA byla získána ze vzorků krve od 145 jedinců pomocí fenol-chloroformové extrakce.

Poté byla sestavena genomická knihovna, která byla obohacena o repetece GT, GA, AAT, AAAG a GATA. Celkově bylo testováno 2016 klonů a 99 z nich obsahovalo mikrosatelity. Pouze 9 z nich obsahovalo vhodnou sekvenci a byly pro ně navrženy páry primerů. Poté proběhla PCR amplifikace na čtyřech lokusech, z nichž tři byly polymorfní. Nicméně dva byly poté z analýzy odebrány, protože jeden obsahoval nulové alely a nebyl pro analýzu vhodný, u druhého se jednalo o polymorfismus způsobený vzácnou inzercí nebo delecí. Pro další analýzy zůstal jen lokus Tch6 se dvěma alelami. Dále autorka navrhla další páry primerů pro 9 mikrosatelitních DNA lokusů, z nichž se šest amplifikovalo, ale pouze jeden byl polymorfní, a to lokus Tch25 se čtyřmi alelami.

U buřňáka šedého popsali Bried *et al.* (2008) 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Variabilita těchto mikrosatelitů byla hodnocena na populaci 43 jedinců buřňáka šedého, která pocházela z Azorských ostrovů. Genomická DNA byla extrahována ze vzorků krve. Bylo testováno 3036 klonů a bylo osekvenováno 262 pozitivních klonů. 15 lokusů s největším počtem nepřerušovaných sekvencí bylo použito pro další amplifikaci. 11 z 15 lokusů bylo polymorfních a vykazovaly 2–8 alel. Lokus Cd4 byl u všech samic homozygotní. Dále byla provedena *cross-species* PCR amplifikace u dalších tří druhů, a to u albatrose stěhovavého, buřňáka bělobradého a Bulwerova. U albatrose stěhovavého došlo k amplifikaci pouze 5 lokusů, z nichž 1 byl polymorfní, u buřňáka bělobradého bylo amplifikováno 7 lokusů a 2 z nich byly polymorfní. Největší počet amplifikovaných lokusů byl zaznamenán u buřňáka Bulwerova, kdy došlo k amplifikaci všech 11 lokusů a 10 z nich bylo polymorfních.

Od buřňáka baleárského izolovali Gonzalez *et al.* (2009) 10 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Genomická DNA byla extrahovaná z tkáně pomocí fenol-chloroformu a proteinázy K a následně byla štěpena pomocí restrikčních enzymů a ligována. DNA byla obohacena o CA a AAAG repetece a následně byla ligována do vektoru a transformovaná do *E. coli*. Bylo vybráno 23 mikrosatelitů pro které byly navrženy páry primerů. Polymorfismus byl hodnocen u 55 jedinců buřňáka baleárského pocházejících ze dvou lokalit na Baleárských ostrovech, a to z Cabrery a Ibizy. Pouze 10 lokusů bylo polymorfních se 2–10 alelami a jeden z nich (Puff Sma6) byl vázán na pohlaví. Dále byla provedena *cross-species* PCR amplifikace u 23 jedinců buřňáka středomořského, u kterých všechny tyto vyvinuté markery byly úspěšně amplifikovány a pouze lokus Puff G2F byl monomorfní, ostatní lokusy byly polymorfní se 2–9 alelami.

Brown *et al.* (2009) charakterizovali šest mikrosatelitních lokusů u buřňáka trinidadského. Vzorky byly odebrány ze tří mrtvých mláďat na Kulatém ostrově v roce 2005. Celková genomická DNA byla izolována z tkání pomocí fenol-chloroformové extrakce. Byla vytvořena genomická knihovna obohacená o (CA)<sub>n</sub> a (CAGA)<sub>n</sub> repetice. Plazmidy obsahující inzerty byly sekvenovány a byly pro ně navrženy primery. Ze 43 testovaných lokusů byly pouze 3 (Parm01–Parm03) polymorfní se 4–10 alelami. Další tři (Parm04–Parm06) byly monomorfní. Všech 6 lokusů bylo testováno na 125 jedincích 17 druhů z řádu trubkonosí a 8 jedincích tučňáka žlutorohého. Buřňák trinidadský byl také testován na *cross-species* PCR amplifikaci pomocí primerů vyvinutých pro 53 mikrosatelitních lokusů izolovaných z buřňáka bělobradého, albatrose stěhovavého a šedohlavého a kulíka mořského. Bylo zjištěno, že 6 lokusů je polymorfních a to Paequ3, Paequ13 (Techow *et al.*, 2004), 10C5 a 12H8 (Dubois *et al.*, 2005) De11 (Burg, 1999) a Calex-01 od kulíka mořského (*Charadrius alexandrinus*) (Küpper *et al.*, 2007).

Andris *et al.* (2010) popsali 11 nových mikrosatelitních lokusů u buřňáka Bulwerova. Genomická DNA byla extrahovaná ze vzorků krve. Mikrosatelitní lokusy byly izolovány z obohacené knihovny o (TG)<sub>10</sub> a (TC)<sub>10</sub> repetice. Celkově bylo prověřeno 768 klonů a 352 pozitivních klonů bylo sekvenováno. 25 lokusů s největším počtem nepřerušovaných sekvencí bylo použito pro další analýzu. Variabilita byla testována u 91 jedinců buřňáka Bulwerova z ostrova Vila. 24 z 25 lokusů bylo polymorfních, ale vybrali pouze 11 z nich. Počet alel byl 2–8. Žádná z testovaných samic nebyla heterozygotní pro lokus Bb11, tím lze předpokládat, že je tento mikrosatelit vázaný na pohlaví. Také provedli *cross-species* PCR amplifikaci u tří dalších druhů z řádu trubkonosí a to u buřňáka modravého (*Halobaena caerulea*), bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*) a buřňáčka Monteirova (*Oceanodroma monteiroi*). Pouze lokusy Bb11 a Bb22 vykazovaly polymorfismus u všech druhů a počty alel autoři neuvedli.

U buřňáka havajského Welch *et al.* (2011) izolovali 10 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Genomická DNA byla extrahována ze vzorků tkáně jednoho samce a jedné samice. DNA byla štěpena na fragmenty o velikosti 200–1000 bp, které byly následně ligovány a poté amplifikovány. Knihovna byla obohacena o fragmenty s mikrosatelitními repeticemi (CA)<sub>10</sub>, (AAAG)<sub>5</sub>, (AAAC)<sub>5</sub> a (AGAGG)<sub>5</sub>. Fragmenty byly ligovány do plazmidů a poté transformovány do *E. coli*. Primery byly navrženy pro 54 klonů. Tyto primery byly testovány na 15 jedincích buřňáka havajského a 10 z nich bylo vyhodnoceno jako polymorfní s 3–10 alelami. Pomocí *cross-species* PCR amplifikace

bylo také u buřňáka havajského testováno 37 již popsanych párů primerů od druhů z řádů trubkonosí, pěvci a dlouhokřídlí (Dawson *et al.*, 1997; Burg, 1999; Given *et al.*, 2002; Techow *et O’Ryan*, 2004; Friesen *et al.*, 2006; Bried *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2008; Brown *et Jordan*, 2009).

Quillfeldt *et al.* (2012) popsali 7 polymorfních mikrosatelitních lokusů u buřňáka útlozobého. Studie byla provedena v období rozmnožování na přelomu let 2006 a 2007 na Falklandských ostrovech. Genomická DNA byla extrahovaná ze vzorků peří (25 dospělých jedinců) a vzorků krve (43 dospělých jedinců a 34 mláďat). Sedm párů primerů amplifikovalo polymorfní produkty, které vykazovaly polymorfismus u 10 vybraných jedinců. Ze 7 mikrosatelitů dva nebyly vhodné pro analýzu otcovství, a to konkrétně Patbel2 a Patbel5. U Patbel2 bylo hodnoceno celkově 16 alel, ale jejich problematická rozlišitelnost vedla ke zvýšené pravděpodobnosti vzniku chyb. U Patbel5 bylo zjištěno, že je homozygotní pro všechny samice a heterozygotní pro všechny samce, proto je tento mikrosatelit s největší pravděpodobností vázaný na chromozom Z.

Hardesty *et al.* (2013) objevili u buřňáka světlonohého 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Genomická DNA byla extrahována ze 46 jedinců, a to pomocí jejich krve nebo peří z kolonií na ostrově Lord Howe u Nového Jižního Walesu v Austrálii, 20 jedinců bylo z Nového Zélandu, 5 ze Západní Austrálie a 13 neznámého původu. DNA byla rozštěpena pomocí restrikčních enzymů. Fragменты o velikosti 300–750 bp byly upraveny a byla sestavena genomová knihovna obohacená o fragmenty obsahující repetice (AAC)<sub>12</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (CATC)<sub>8</sub> a (TAGA)<sub>8</sub>. Molekuly byly amplifikovány a rozštěpeny a výsledné fragmenty byly ligovány do klonovacího místa plazmidu. Při testování 84 jedinců ze tří odlišných populací a dalších 13 jedinců neznámého původu, vykazovalo všech 11 lokusů polymorfismus se 3–13 alelami.

Moodley *et al.* (2015) vyvinuli sadu 25 polymorfních mikrosatelitních markerů pomocí shotgun sekvenování genomu buřňáka útlozobého. Genomická DNA byla získána z krve, svalové tkáně a brků per. Páry primerů byly navrženy pomocí programu Primer 3. Bylo testováno 36 párů primerů na *cross-species* PCR amplifikaci a polymorfismus mezi dalšími čtyřmi nepříbuznými jedinci buřňáka útlozobého a třemi jedinci buřňáka holubího bylo 26 lokusů identifikováno jako polymorfních. Bylo zjištěno, že lokus Pacbel\_00829 je ve významné vazbě s lokusem Pacbel\_03731 a Pacbel\_08509, proto byl z dalších analýz vyrazen. Polymorfismus byl testován u 77 jedinců buřňáka

útlozobého ze souostroví Kergueleny, Falklandy a ostrova Noir, kdy největší polymorfismus byl na lokusu Pacbel\_03731 u kterého bylo zjištěno 48 alel. Následným testováním těchto mikrosatelitů *cross-species* PCR amplifikací u buřňáka širokozobého (*P. vittata*), holubího (*Pachyptila desolata*), Salvinova (*P. salvini*), hrdliččího (*P. turtur*), modravého (*Halobaena caerulea*) a buřňáčka Wilsonova (*Oceanites oceanicus*) byl zjištěn největší polymorfismus na lokusu Pacbel\_03731 s 51 alelami.

### 3.6.3 Mikrosatelity od druhů z čeledi buřňáčkovití

Z čeledi buřňáčkovití laboratoř disponuje 54 páry primerů, které byly popsány ve 3 člancích u 3 druhů – buřňáčka dlouhokřídlého (*Oceanodroma leucorhoa*), madeirského (*O. castro*) a Monteirova (*O. monteiroi*).

Sun *et al.* (2009) vyvinuli primery pro 10 mikrosatelitních lokusů od buřňáčka dlouhokřídlého a buřňáčka madeirského. Genomická knihovna byla vytvořena ze 7 zmrazených vzorků krve jedinců buřňáčka madeirského. DNA byla štěpena restrikcí enzymem za vzniku fragmentů o velikosti 200–1200 bp. Fragmentsy byly defosforylovány a ligovány. Hybridizovaný produkt byl obohacen pomocí směsi tří biotinylovaných oligonukleotidových sond: (AC)<sub>13</sub>, (AG)<sub>13</sub> a (GAA)<sub>8</sub>. Hybridizovaná DNA byla izolována a byla sestavena knihovna 96 klonů, z nichž 53 bylo sekvenováno. Variabilita byla testována u 27 buřňáčků madeirských, 22 buřňáčků Monteirových z Azorských ostrovů a u 24 buřňáčků dlouhokřídlých z Norska. U buřňáčků madeirských a Monteirových bylo 9 lokusů polymorfních se 2–11 alelami a u buřňáčků dlouhokřídlých bylo 8 lokusů polymorfních se 2–9 alelami. *Cross-species* PCR amplifikace byla testována na buřňáčku galapážském a límcovém a na buřňáku tmavohřbetém. Produkty amplifikace byly získány pro všechny lokusy s výjimkou Oc64B a Oc79-2. Informace o polymorfismu a počtu alel autoři neuvádějí.

U buřňáčka dlouhokřídlého popsali Bicknell *et al.* (2011) celkem 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly získány od 24 nepříbuzných jedinců na kanadském ostrově Gull. Genomická DNA byla získána z krve. Genomová knihovna byla obohacena o fragmenty s repeticemi (GT)<sub>n</sub>, (CT)<sub>n</sub>, (GTAA)<sub>n</sub>, (CTAA)<sub>n</sub>, (TTTC)<sub>n</sub> a (GATA)<sub>n</sub>. Páry primerů byly navrženy pro 50 jedinečných mikrosatelitních sekvencí a ty byly otestovány na 4–6 nepříbuzných jedincích buřňáčka dlouhokřídlého. Z 50 nových lokusů se 6 neamplifikovalo, 18 bylo monomorfních a 26 polymorfních. Dále na jedincích otestovali 47 lokusů, které již dříve byly popsány Dawson *et al.* (2010). Ze 47 lokusů se

2 lokusy neamplifikovaly nebo vznikly nesespecifické produkty, 30 bylo monomorfních a 15 polymorfních, jejichž páry primerů byly odvozeny z DNA buňňáčka madeirského a zebřičky pestré (Sun *et al.*, 2009). Celkem 41 polymorfních lokusů bylo následně testováno na 24 nepříbuzných jedincích (14 samců a 10 samic), u nichž se vyskytovaly ve 2–22 alelách. Zjistili, že lokusy Ole16, Ol10-39, Ole12 a Ole26 jsou vázány na chromozom Z.

Bried *et al.* (2012) popsali 18 nových mikrosatelitních lokusů u buňňáčka Monteirova. DNA byla extrahována z jednotlivých vzorků krve. Mikrosatelitní lokusy byly izolovány z obohacených knihoven. Dvacet sedm lokusů s největším počtem nepřetržitě se opakujících sekvencí bylo použito pro další analýzy. Nicméně pouze 18 z nich bylo zachováno, protože u nich nebyly problémy během amplifikace a heterozygotnost byla dostatečná. Variabilita na těchto 18 lokusech byla zkoumána na 125 dospělých jedincích buňňáčka Monteirova z ostrůvku Praia. Na jeden lokus bylo detekováno 4–17 alel. Žádná z 65 samic nebyla v lokusu Omn23 heterozygotní. Také provedli mezidruhovou PCR amplifikaci u buňňáčka madeirského (*O. castro*), buňňáčka modravého (*Halobaena caerulea*) a buňňáčka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*). Mezidruhová amplifikace byla nejúspěšnější u buňňáčka madeirského, kde vykazovalo polymorfismus sedmnáct lokusů se 2–6 alelami. U buňňáčka Bulwerova vykazovaly polymorfismus tři lokusy se dvěma alelami, u buňňáčka modravého dva lokusy se dvěma a šesti alelami.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál pro analýzu pocházel od různých mlád'at čápa bílého (*Ciconia ciconia*), která byla odchycena na území České republiky. Z odebrané krve šesti nepříbuzných jedinců byla vyizolována genomická DNA vedoucím mé bakalářské práce za použití fenol-chloroformové metody. Koncentrace izolované DNA, která byla rozpuštěna v TE pufru se pohybovala v rozmezí od 10 do 50 µg/ml.

### 4.2 Seznam použitých chemikálií

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5 U/µl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l, 400 µl každého), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na<sub>2</sub>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 Seznam použitých roztoků

- Akrylamid, 6% zásobní roztok:
  - 420 g močoviny
  - 50 ml 10x TBE
  - 484 ml deionizované vody
  - 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N, N' - methylenbisakrylamid 19:1
  - Všechny složky rozpustit, poté zfiltrvat a uchovat v chladničce v tmavé láhvi
- Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok:
  - 0,8 g dusičnanu stříbrného
  - 800 ml deionizované vody
  - Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu
- Fix/stop roztok:
  - 88 ml ledové kyseliny octové
  - 800 ml deionizované vody
- Hydroxid sodný o koncentraci 1 mol/dm<sup>3</sup>:
  - 40 g hydroxidu sodného
  - 1 l deionizovaného vody
- Kyselina dusičná, 1% roztok:
  - 12 ml 65% kyseliny dusičné
  - 800 ml deionizované vody
- Nanášecí pufr:
  - 25 ml deionizované vody
  - 100 ml formamidu
  - 0,125 g xylenové modře
  - 0,125 g bromfenolové modře
- Peroxodisíran amonný, 10% roztok:
  - 1 g peroxodisíranu amonného
  - 10 ml deionizované vody
  - Uchovávat v chladničce
- Polyakrylamidový gel, 6% roztok:
  - 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
  - 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného
  - 40 µl N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu



- Reakční pufru pro PCR, 10x:
  - 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu
  - 80 ml deionizované vody
  - Upravit pH pomocí HCl na hodnotu 9,0
  - 3,73 g KCl
  - 1 ml Triton X-100
  - Rozpustit a doplnit do 100 ml
- Roztok 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu:
  - 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
  - 3 µl 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu
- TBE pufr, 10x zásobní roztok:
  - 55 g kyseliny borité
  - 108 g trishydroxymethylaminomethanu
  - 40 ml roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
  - Deionizovanou vodou doplnit do 1 l
- Vývojka:
  - 24 g uhličitanu sodného
  - 800 ml deionizované vody
  - Uložit do chladničky
  - Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl thiosíranu sodného

#### **4.4 Seznam použitých laboratorních přístrojů**

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiquette - 0,5 až 10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl až 1 ml (ThermoLab systems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA 1 (Maneko)

- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler TP XP (BIOER)
- Třepačka Orbit 1900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Ice Flaker (Brema IceMakers)

#### 4.5 PCR amplifikace DNA čápa bílého

PCR amplifikace byla provedena na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého. PCR reakční směs byla připravena a do každého PCR mixu byl přidán jeden pár testovaných primerů.

1. Všechny složky PCR mixu rozmrazit, následně zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Do 1,5ml mikrozkušavek napipetovat reagenty podle Tabulky č. 1, poté PCR mix zvortexovat a zcentrifugovat.

**Tabulka č. 1:** Složení PCR směsi pro 6 vzorků.

Složka PCR směsi	Objem [μl]
Deionizovaná voda	39,9
Reakční pufr pro PCR (10x)	6,7
Roztok MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7
Primer R (10 μmol/l)	3,3
Primer F (10 μmol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U/μl)	1,5

3. Do 0,2ml mikrozkušavek napipetovat 1 μl genomické DNA čápa bílého a poté přidat 9 μl připraveného PCR mixu.
4. Mikrozkušavky vložit do termocykleru s nastavenými teplotními a časovými podmínkami podle schématu:

94 °C: 5 min

35 x: 94 °C: 30 s

50 °C: 30 s                      35 cyklů

72 °C: 30 s

72 °C: 7 min

Podle tohoto schématu probíhala počáteční reakce s každým párem primerů. Následně při případném dalším opakování byla teplota *annealingu* primerů upravovaná pro jednotlivé mikrosatelity (detaily viz kapitola Výsledky).

#### 4.6 Amplifikované mikrosatelitní lokusy u čápa bílého

Celkově bylo ke *cross-species* PCR amplifikaci použito 213 párů primerů, kdy 207 párů bylo navrženo pro PCR amplifikaci mikrosatelitů z řádu trubkonosí (Procellariiformes), 1 pro lesňáčka žlutohého z řádu pěvci (Passeriformes) a zbývajících 5 pro zástupce řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) a to pro kulíka mořského, racka novozélandského a alkouna obecného. Seznam těchto mikrosatelitů je uveden v tabulkách č. 2, 3, 4 a 5.

**Tabulka č. 2:** Seznam mikrosatelitů od druhů z čeledi albatrosovití testovaných na polymorfismus u čápa bílého.

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

**Tabulka č. 3:** Seznam mikrosatelitů od druhů z čeledi buňňákovití testovaných na polymorfismus u čápa bílého.

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

**Tabulka č. 4:** Seznam mikrosatelitů od druhů z čeledi buřňáčkovití testovaných na polymorfismus u čápa bílého.

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

**Tabulka č. 5:** Seznam mikrosatelitů od druhů z řádu dlouhokřídlí a pěvci testovaných na polymorfismus u čápa bílého.

Řád	Čeď	Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literární zdroj
Dlouhokřídlí	Alkovití	Alkoun obecný ( <i>Cephus guillemonts</i> )	Cco5-21	Friesen <i>et al.</i> , 2006
	Kulíkovití	Kulík mořský ( <i>Charadrius alexandrinus</i> )	Calex-01	Brown <i>et al.</i> , 2009 podle Küpper <i>et al.</i> , 2007
	Rackovití	Racek novozélandský ( <i>Larus novaehollandiae scopulinus</i> )	RBG18, RBG18M, RBG29	Lawrence, 2008, Welch <i>et al.</i> , 2011 podle Given <i>et al.</i> , 2002
Pěvci	Lesňáčkovití	Lesňáček žlutohý ( <i>Dendroica petechia</i> )	Dpμ01	Friesen <i>et al.</i> , 2006 podle Dawson <i>et al.</i> , 1997

#### 4.7 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace

Postup je optimalizován pro elektroforetickou separaci probíhající za denaturujících podmínek za použití vyhřívané sekvenční elektroforetické komůrky S2 (Whatman Biometra). Rozměry skel určených pro tuto komůrku jsou 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťka gelu je 0,4 mm.

1. Plochu malého i velkého skla, která se bude dotýkat gelu 2x opláchnout deionizovanou vodou a vysušit papírovou utěrkou a 2x opláchnout 96% ethanolem a opět obě skla vysušit.
2. Plochu velkého skla ošetřit přípravkem pro odpuzování vody (Rain-off) a následně pomocí papírového ubrousku důkladně rozetřít po celé ploše. Po zaschnutí (5 min) opět sklo 2x opláchnout deionizovanou vodou a znovu osušit papírovou utěrkou.
3. Plochu malého skla ošetřit v digestoři 1 ml roztoku 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu, který poté pomocí papírového ubrousku rozetřít po celé ploše skla. Po zaschnutí (5 min) sklo 4x opláchnout 96% ethanolem a znovu vysušit.
4. Na polystyrenovou podložku umístěnou v digestoři položit velké sklo ošetřenu plochou nahoru a na jeho delší okraje umístit dva 0,4mm spacers. Následně na velké sklo položit malé sklo ošetřenu plochou dolů a spacers srovnat až do krajů skel a sepnout po obou stranách dvěma klipsy.
5. V kádince připravit 6% polyakrylamidový gel a postupně ho nalévat mezi skla a přitom na sklo druhou rukou lehce poklepávat, aby nedošlo ke vzniku vzduchových bublin.
6. Po nalití gelu vsunout mezi skla hřebínek asi 5 mm hluboko a v místě hřebínku sepnout skla čtyřmi klipsy a nechat gel hodinu tuhnout.
7. Po ztuhnutí gelu sundat klipsy a skla důkladně omýt vodou a pomocí kartáčku odstranit všechny zbytky polyakrylamidového gelu hlavně v oblasti hřebínku. Menší sklo usušit pomocí papírové utěrky a skla upevnit do elektroforetické komůrky tak, aby menší sklo směřovalo k hliníkové desce komůrky a hřebínkem nahoru.
8. Do katodového a anodového prostoru nalít 0,5x TBE pufr a následně vytáhnout opatrně hřebínek. Prostor po hřebínku vyčistit pomocí stříkačky a pufru. Oba prostory uzavřít a připojit elektrody ke zdroji stejnosměrného napětí a následně gel 30 min zahřívát při nastavení zdroje: napětí 3000 V, proud 150 mA a výkon 90 W.
9. Mezitím si připravit vzorky, ke každému produktu PCR přidat 5  $\mu$ l nanášecího pufru. Poté vzorky vložit do termocykleru a nechat denaturovat po dobu 3 minut. Po denuraci vzorky ihned umístit do ledové tříště.
10. Po nahřátí gelu vypnout zdroj stejnosměrného napětí, odpojit katodu a znovu vyčistit prostor mezi skly pomocí stříkačky. Následně vsunout hřebínek asi 1 mm

hluboko do gelu a dále nanášet pomocí osmikanálové pipety 2  $\mu$ l připravených vzorků.

11. Po nanesení všech vzorků uzavřít katodový prostor, připojit elektrodu a na zdroji stejnosměrného napětí nastavit hodnotu výkonu na 70 W a nechat vzorky separovat 1,5–3 hod, v závislosti na relativní molekulové hmotnosti.
12. Mezitím si připravit roztoky k vyvolování a to fix/stop roztok, vývojkou a 1%  $\text{HNO}_3$ . Vývojkou po protřepání vložit do chladničky.
13. Elektroforetickou separaci ukončit vypnutím zdroje stejnosměrného elektrického proudu, odpojit elektrody a vypustit pufr. Skla vyjmout, položit na fotomisku malým sklem nahoru, vytáhnout spacers a hřebínek a pomocí nože opatrně skla od sebe oddělit.
14. Menší sklo s gelem vložit do fotomisky gelem nahoru, přenést do digestoře na třepáčku a zalít fix/stop roztokem, nechat působit 20 min.
15. Následně fix/stop roztok slít zpět do baňky a sklo 3x promýt deionizovanou vodou. Poté do misky nalít roztok 1%  $\text{HNO}_3$  a nechat působit 4 min.
16. Roztok  $\text{HNO}_3$  vylít do odpadu a sklo 4x opláchnout deionizovanou vodou. Do roztoku 0,1%  $\text{AgNO}_3$  přidat 1,2 ml formaldehydu. Sklo přemístit do další fotomisky a zalít připraveným roztokem a nechat působit 30 min
17. Připravit fotomisku s deionizovanou vodou a do baňky s vývojkou přidat 1,2 ml formaldehydu a 140  $\mu$ l roztoku thiosíranu sodného.
18. Po uplynutí 30 minut roztok 0,1%  $\text{AgNO}_3$  slít zpět do baňky a sklo umístit na 5 sekund do připravené vody. Následně sklo přemístit do další fotomisky a zalít gel vývojkou.
19. Postupně sledovat vyvíjení hnědočerných pruhů produktů PCR, pokud jsou pruhy dostatečně zřetelné zalít sklo fix/stop roztokem, aby došlo k zastavení vyvíjení a nechat působit asi 2 min.
20. Sklo přemístit do misky s deionizovanou vodou, nechat okapat a poté přenést do sušárny na přibližně 30 min při 90 °C.
21. Usušený gel hodnotit na negatoskopu a poté naskenovat.

## 5 Výsledky

V rámci experimentální části mé bakalářské práce jsem testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace celkově 213 párů primerů. 207 párů primerů pocházelo od zástupců z řádu trubkonosí - 53 od druhů z čeledi albatrosovití, 100 od druhů z čeledi buňňákovití a 54 od druhů z čeledi buňňáčkovití. Dále 5 párů primerů od zástupců z řádu dlouhokřídlí, a to od alkouna obecného, kulíka mořského a racka novozélandského a jeden pár primerů od lesňáčka žlutonohého z řádu pěvci. Všechny mikrosatelitní lokusy jsem testovala na 6 nepříbuzných jedincích čápa bílého a byly hledány polymorfní mikrosatelitní lokusy.

Testování párů primerů probíhalo při teplotě *annealingu* 50 °C a následně byly teploty upravovány v závislosti na konkrétním polymorfním mikrosatelitu. V případě žádného nebo slabého PCR produktu byla teplota *annealingu* postupně snižována až na 44 °C, naopak v případě velmi silného a špatně hodnotitelného produktu byla teplota *annealingu* postupně zvyšována až na 69 °C. Dále byla upravována koncentrace hořčnatých iontů v PCR mixu, a to z původní koncentrace (objemu) na koncentraci poloviční nebo třičtvrtěční (tedy objem poloviční nebo třičtvrtěční) a o stejný objem byla doplněna voda, aby nedošlo ke změně celkového objemu PCR reakce. Tato změna byla provedena u dvou mikrosatelitů a to u Puff G2F a u Pacbel\_07265.

Ze všech testovaných mikrosatelitů poskytlo polymorfní produkt 18 párů primerů (viz Tabulka č. 6). U mikrosatelitního lokusu Paequ2 se mi nepodařilo ani po úpravách teploty PCR reakce získat žádný produkt. Zbývajících 194 lokusů poskytlo monomorfní produkt.



**Tabulka č. 6:** Charakteristika 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů testovaných na 6 nepříbuzných jedincích čápa bílého. V tabulce je uveden název lokusu s kódem z databáze GenBank, dále zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel, čas elektroforetické separace a teplota *annealingu* ( $T_a$ ).

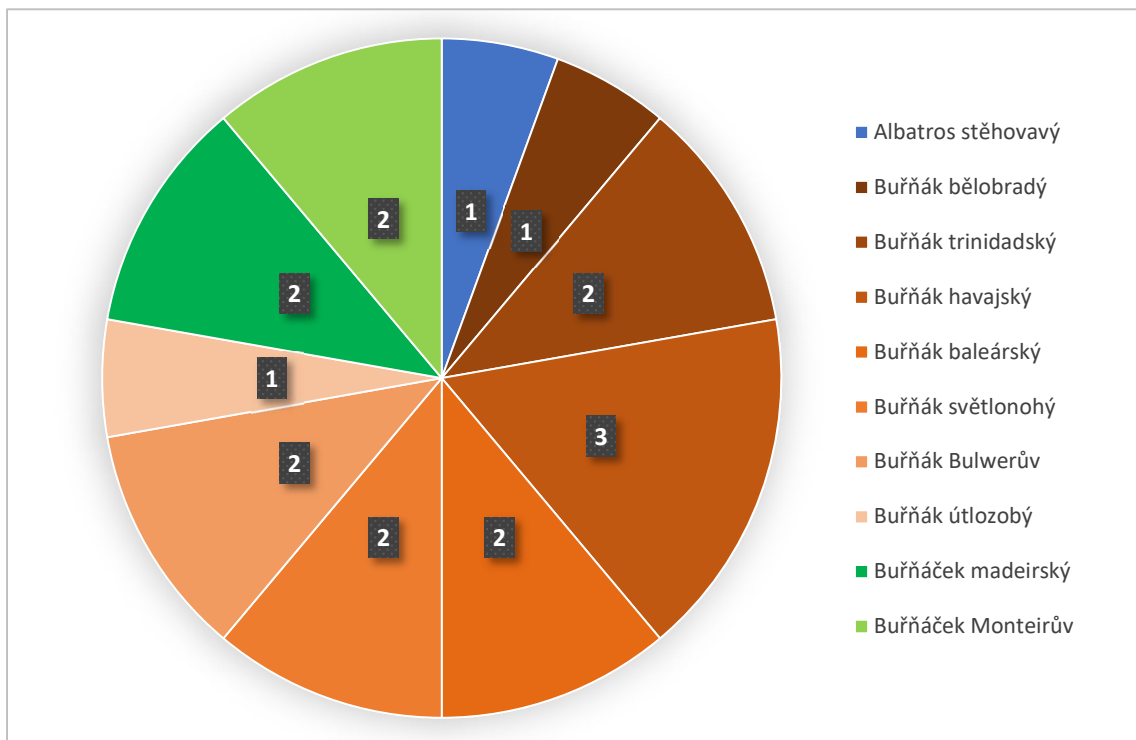
Lokus (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Počet alel	Čas separace [min]	$T_a$ [°C]
De7 (AF096792)	Albatros stěhovavý	F: GAGGAAACTCCATCTGCCA R: TCTGAACCTCTATCAAAGG	AC	2	90	62
Paequ10 (neuvedeno)	Buňák bělobradý	F: GAAGCTGCACTGGAAGT R: CATGTGGTAAGAATCCAGATG	CA	2	90	61
Parm02 (EU360818)	Buňák trinidatský	F: AGCAAGCTGACAGCAACAGA R: TGTTATGTCCTGCGGATGAG	CA	3	90	67
Parm05 (EU360821)		F: CGTATACCCTGCAGATACGC R: CTCAGTGCCAATTCGTACCC	CA	2	90	60
Ptero02 (HQ918219)	Buňák havajský	F: AAGCGCTTCACTGGAGGA R: TGACCTGTGTGCCTTCATTC	CA	4	90	53
Ptero04 (HQ918221)		F: TGCATTGTTTCTGTCCAACTC R: GGCTGGAATGCATAGTACCAAC	CA	2	90	67
Ptero09 (HQ918226)		F: GCAAATACCAGTCTTCCAAAGG R: TTTAAGATAAAGATGTTTGAGAACCAC	AAGG	4	90	65
Puff G2C (EU158898)	Buňák baleárský	F: CTGAAATCAGACATTATTTC R: ACAATATGCAAACCTTTTG	GT	3	90	56
Puff G2F* (EU158899)		F: GCTCTCCCAGTTTGCACG R: TCCCATGCTTTAACCACTG	GT	2	180	58
Pc A107 (JX435472)	Buňák světlonohý	F: AAAGCCAGTAGGTGTATTCAAC R: AAGTGGGAGGAAAGAGTGTAG	GT	2	90	59

**Tabulka č. 6:** Pokračování.

<b>Lokus (GenBank Acc. No.)</b>	<b>Zdrojový druh</b>	<b>Sekvence primerů (5' → 3')</b>	<b>Jednotka repetice</b>	<b>Počet alel</b>	<b>Čas separace [min]</b>	<b>T<sub>a</sub> [°C]</b>
Pc D103 (JX435479)	Buňák světlonohý	F: GGAAAGATGTCATGCTGATGA R: GTGGGAGATTCATAGGCAAAG	GATA/GATG	3	90	51
Bb22 (HM171898)	Buňák Bulwerův	F: TTCACAGCAGAATCACCTCAG R: GCTCAAAGGGTGGAATTGTT	TG	2	90	62
Bb23 (HM171899)		F: TCAAAAGCTCACTCCCCTTT R: ATCTTCCCTTGCCCTTCCTTT	CA	2	90	51
Pacbel_07265* (neuvedeno)	Buňák útlózobý	F: CGTCACTTTAATAGCGCTGGC R: ACCCTGATTTTCCCAGTCCG	GT	5	90	56
Oc28B (FJ238097)	Buňáček madeirský	F: GCGTTGACCAGCAAATAGTC R: GGAAGGCTACCACAATTTCA	TG	2	90	55
Oc87B (FJ238104)		F: TTTAAGGAACGCAAGTCAGG R: GTGATTCTTGCAAGTGGCTTT	GA	2	90	53
Omn8 (JQ303232)	Buňáček Monteirův	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTTAA	AC	6	90	61
Omn23 (JQ303240)		F: GGAAAAGGAGACTAGATCTTGTGAA R: AAACCTACTTTGTTATTTCCATATGTTT	TTG	2	90	61

Pozn.: \* - tříčtvrteční koncentrace hořčnatých iontů v PCR mixu

Z celkově testovaných 213 párů primerů poskytlo polymorfní produkt 18, tudíž je úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitu 8,5 %. Všechny polymorfní mikrosatelity pocházely od druhů ze tří čeledí řádu trubkonosí. Pouze jeden mikrosatelitní lokus pocházel z čeledi albatrosovití, čtyři z čeledi buňňáčkovití a zbytek polymorfních mikrosatelitů tedy 13 pocházelo od zástupců z čeledi buňňáčkovití. V rámci buňňáčkovitých bylo testováno 100 párů primerů a procentuální úspěšnost nalezení polymorfního produktu činila 13 %. Nejvíce polymorfních mikrosatelitů u čápa bílého bylo zaznamenáno původem od buňňáka havajského, a to tři mikrosatelity. Procentuální úspěšnost nalezení polymorfního produktu od čeledi buňňáčkovití, kde bylo testováno 54 párů primerů činila 7,4 % a od čeledi albatrosovití, kde bylo pomocí *cross-species* PCR amplifikací testováno 53 párů primerů přibližně 2 %. Přehled polymorfních produktů u čápa bílého je zaznamenán na Obrázku č. 3.



**Obrázek č. 3:** Přehled 18 mikrosatelitních lokusů, které byly polymorfní u čápa bílého vzhledem ke zdrojovým druhům. Čísla udávají počet nalezených polymorfních mikrosatelitů od jednotlivých druhů.

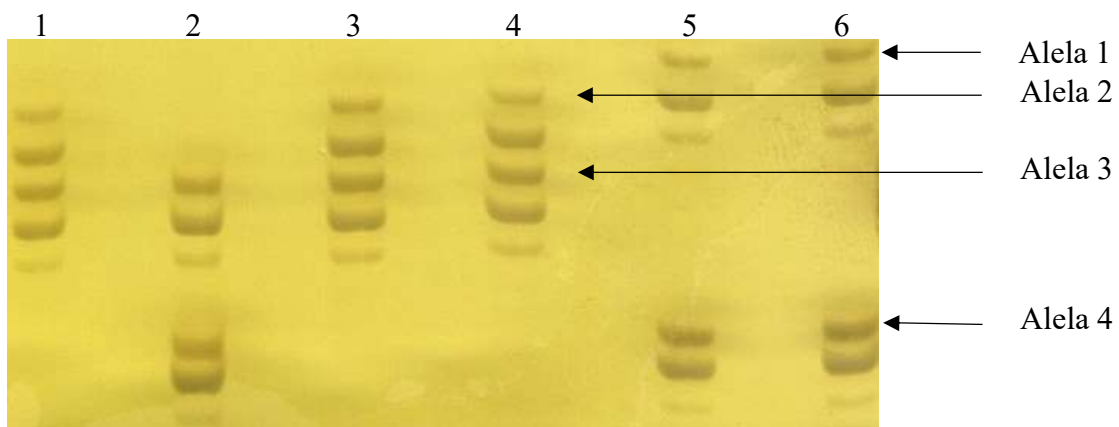
V rámci testovaných polymorfních mikrosatelitních lokusů bylo detekováno 2–6 alel. U 11 mikrosatelitních lokusů, tudíž u 61 %, jsem detekovala dvě alely, u 3 lokusů (17 %) tři alely, u 2 lokusů (11 %) čtyři alely, u 1 lokusu (5,5 %) pět alel a u 1 lokusu (5,5 %) šest alel.

V následující tabulce jsou uvedeny genotypy všech 18 polymorfních mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého.

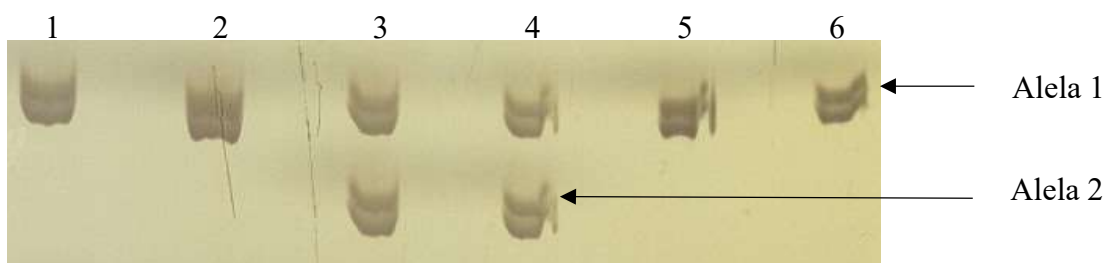
**Tabulka č. 7:** Genotypy 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců čápa bílého. V tabulce je uveden název mikrosatelitního lokusu, zdrojový druh, počet alel a genotypy.

Mikrosatelit	Zdrojový druh	Počet alel	Genotyp u jedince					
			1	2	3	4	5	6
De7	Albatros stěhovavý	2	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/2$	$1/1$
Paequ10	Buřňák bělobradý	2	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/2$
Parm02	Buřňák trinidadský	3	$1/2$	$2/3$	$1/3$	$1/3$	$3/3$	$2/3$
Parm05		2	$1/1$	$1/2$	$1/1$	$1/1$	$1/2$	$1/2$
Ptero02	Buřňák havajský	4	$2/3$	$3/4$	$2/3$	$2/3$	$1/4$	$1/4$
Ptero04		2	$1/1$	$1/2$	$1/2$	$1/2$	$1/1$	$1/1$
Ptero09		4	$2/4$	$1/4$	$2/3$	$1/2$	$2/2$	$2/3$
Puff G2C	Buřňák baleárský	3	$3/3$	$2/3$	$1/3$	$1/3$	$3/3$	$3/3$
Puff G2F		2	$2/2$	$2/2$	$2/2$	$2/2$	$1/1$	$1/1$
Pc A107	Buřňák světlonohý	2	$1/1$	$2/2$	$2/2$	$1/2$	$1/2$	$1/2$
Pc D103		3	$2/3$	$1/2$	$2/2$	$2/2$	$1/2$	$2/3$
Bb22	Buřňák Bulwerův	2	$1/2$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$
Bb23		2	$1/1$	$1/2$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$
Pacbel_07265	Buřňák útlozobý	5	$1/5$	$1/1$	$3/3$	$3/3$	$2/4$	$2/4$
Oc28B	Buřňáček madeirský	2	$1/1$	$1/2$	$1/2$	$1/2$	$1/2$	$1/2$
Oc87B		2	$1/1$	$1/1$	$1/2$	$1/2$	$1/1$	$1/1$
Omn8	Buřňáček Monteirův	6	$1/5$	$3/4$	$2/6$	$2/4$	$2/5$	$2/5$
Omn23		2	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/1$	$1/2$	$1/2$

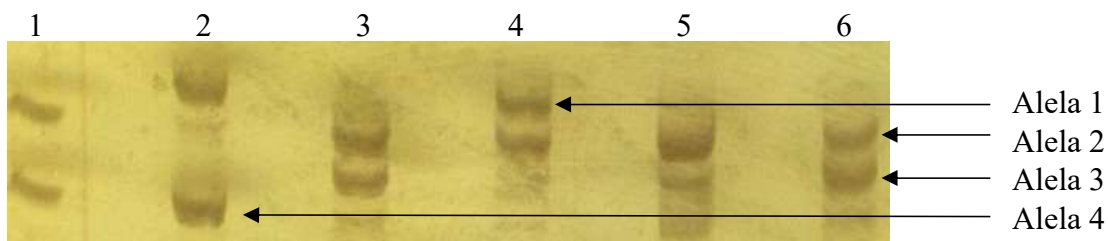
Hodnocení mikrosatelitů neznamena jenom určení optimálních podmínek PCR amplifikace a elektroforetického dělení, ale důležitý je i jejich výsledný obraz v gelu, protože různé mikrosatelity mohou obsahovat nejenom hlavní produkt PCR amplifikace, ale i další extrabandy a další produkty, proto je jejich následné hodnocení problematické a výsledky polymorfismu pak mohou být nespolehlivé. Naopak jiné mikrosatelity jsou velice dobře hodnotitelné například Ptero02 (viz Obrázek č. 4), Oc87B (viz Obrázek č. 5), Ptero09 (viz Obrázek č. 6) a Pc D103 (viz Obrázek č. 7).



**Obrázek č. 4:** Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Ptero02 u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého. Amplifikace tohoto lokusu probíhala při 53 °C a separaci 90 minut. Šipkami jsou na obrázků vyznačeny 4 alely. Číslice 1–6 označují jednotlivé jedince.



**Obrázek č. 5:** Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Oc87B u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého. Amplifikace tohoto lokusu probíhala při 53 °C a separaci 90 minut. Šipkami jsou na obrázků vyznačeny 2 alely. Číslice 1–6 označují jednotlivé jedince.



**Obrázek č. 6:** Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Ptero09 u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého. Amplifikace tohoto lokusu probíhala při 65 °C a separaci 90 minut. Šipkami jsou na obrázků vyznačeny 4 alely. Číslice 1–6 označují jednotlivé jedince.



**Obrázek č. 7:** Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu Pc D103 u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého. Amplifikace tohoto lokusu probíhala při 51 °C a separaci 90 minut. Šipkami jsou na obrázků vyznačeny 3 alely. Číslice 1–6 označují jednotlivé jedince.

## 6 Diskuze

V této bakalářské práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitních lokusů pomocí *cross-species* PCR amplifikace u šesti nepříbuzných jedinců čápa bílého. Celkově jsem testovala 213 párů primerů, kdy 207 párů primerů pocházelo od druhů z řádu trubkonosí, 5 od druhů z řádu dlouhokřídlí a 1 od zástupce z řádu pěvců. V rámci mé experimentální práce jsem našla 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů s počtem alel od dvou do šesti.

Od čeledi albatrosovití jsem měla k dispozici 53 párů primerů, které jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovala u šesti jedinců čápa bílého. V rámci této čeledi poskytl polymorfní produkt pouze jeden mikrosatelitní lokus a to De7 pocházející od albatrose stěhovavého. V rámci čeledi buňákovití bylo celkově testováno 100 párů primerů a polymorfní produkt poskytlo 13 z nich, a to Paequ10 od buňáka bělobradého, Parm02 a Parm05 od buňáka trinidadského, Ptero02, Ptero04 a Ptero09 od buňáka havajského, Puff G2C a Puff G2F od buňáka baleárského, Pc A107 a Pc D103 od buňáka světlonohého, Bb22 a Bb23 od buňáka Bulwerova a Pacbel\_07265 od buňáka útlozobého. Pro čeleď buňáčkovití jsem měla k dispozici 54 párů primerů, kdy polymorfní mikrosatelitní lokus poskytly čtyři, a to Oc28B a Oc87B od buňáčka madeirského a Omn8 a Omn23 od buňáčka Monteirova.

Burg (1999) testovala 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly izolovány od albatrose šedohlavého a albatrose stěhovavého. Při PCR amplifikaci použila dvě teploty *annealingu*. U mikrosatelitu De7 byla teplota *annealingu* prvních sedm cyklů 48 °C a poté dalších 25 cyklů při teplotě 52 °C a autorka našla 2 alely. Já jsem u čápa bílého při teplotě *annealingu* 62 °C našla také 2 alely. Při *cross-species* PCR amplifikaci u 50 jedinců albatrose šedohlavého, 50 jedinců albatrose černobrvého a 90 jedinců albatrose stěhovavého našla autorka u všech také 2 alely.

Techow *et al.* (2004) izolovali 6 polymorfních mikrosatelitních lokusů od buňáka bělobradého. U mikrosatelitního lokusu Paequ10 našli u 69 jedinců 7 alel při  $T_a$  55 °C. Já jsem u tohoto mikrosatelitu našla 2 alely při  $T_a$  61 °C. Tyto mikrosatelity testovali pomocí *cross-species* PCR amplifikace u buňáka tristanského, obrovského a Hallova, albatrose stěhovavého, šedohlavého a černobrvého. Paequ10 vykazoval

polymorfismus u všech druhů s výjimkou albatrose stěhovavého, kde nebyl žádný produkt. Počty alel autoři neuvádějí.

Brown *et* Jordan (2009) charakterizovali 6 mikrosatelitních lokusů u buřňáka trinidadského. U lokusu Parm02 detekovali 4 alely při  $T_a$  55 °C, já jsem u tohoto mikrosatelitu našla 3 alely při  $T_a$  67 °C. Parm05 byl jimi označen jako monomorfní, zatímco já jsem našla 2 alely při  $T_a$  60 °C. Všechny tyto lokusy testovali pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 17 druhů z řádu trubkonosí a na tučňáku žltorohém. Parm02 byl polymorfní u 4 druhů z řádu trubkonosí a to u 17 jedinců buřňáka proměnlivého, 12 jedinců buřňáka bělobradého a 8 jedinců buřňáka holubího se 3 alelami, 1 jedince buřňáka modravého se 2 alelami a u 8 jedinců tučňáka žltorohého s 5 alelami. Parm05 byl polymorfní u tří druhů z řádu trubkonosí a to u 17 jedinců buřňáka proměnlivého se 2 alelami, 8 jedinců buřňáka madeirského se 3 alelami a u 8 jedinců buřňáka kapverdského se 2 alelami, u jednoho druhu byl monomorfní a u dalších nedošlo k amplifikaci.

Welch *et* Fleischer (2011) popsali 10 polymorfních mikrosatelitních lokusů od buřňáka havajského. Testováním 40 jedinců buřňáka havajského našli u mikrosatelitu Ptero02 pět alel, u Ptero04 osm alel a u Ptero09 sedm alel při  $T_a$  53 °C. Já jsem u Ptero02 našla čtyři alely při  $T_a$  53 °C, u Ptero04 dvě alely při  $T_a$  67 °C a u Ptero09 čtyři alely při  $T_a$  65 °C.

Gonzalez *et al.* (2009) izolovali 10 polymorfních mikrosatelitních lokusů od 54 jedinců buřňáka baleárského. Puff G2C byl polymorfní se 7 alelami při teplotě *annealingu* 50 °C a Puff G2F měl 2 alely při teplotě *annealingu* 60 °C. Já jsem u lokusu Puff G2C našla 3 alely při  $T_a$  56 °C a u lokusu Puff G2F také 2 alely při teplotě  $T_a$  58 °C a s tříčtvrteční koncentrací hořecnatých iontů. Autoři také provedli se všemi 10 mikrosatelity *cross-species* PCR amplifikaci u 23 jedinců buřňáka středomořského, všechny mikrosatelity amplifikovaly polymorfní produkt se 2–9 alelami, pouze Puff G2F byl monomorfní.

Hardesty *et al.* (2013) našli u buřňáka světlonohého 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů. U lokusu Pc A107 autoři detekovali pět alel při  $T_a$  55,2 °C a u lokusu Pc D103 šest alel při  $T_a$  58,7 °C. Já jsem u Pc A107 našla dvě alely při  $T_a$  59 °C a u lokusu Pc D103 tři alely při  $T_a$  51 °C.



Andris *et al.* (2010) izolovali 11 mikrosatelitních lokusů od buňáka Bulwerova. U mikrosatelitu Bb22 zjistili 2 alely, já jsem u tohoto mikrosatelitu také zjistila dvě alely. U mikrosatelitu Bb23 detekovali 3 alely, zatímco já jsem u tohoto mikrosatelitu detekovala alely 2. Jejich amplifikace probíhala při  $T_a$  58°C. Já jsem amplifikovala mikrosatelit Bb22 při teplotě *annealingu* 62 °C a Bb23 při 51 °C. Autoři také provedli *cross-species* PCR amplifikaci u buňáka modravého a bělobradého a u buňáčka Monteirova. Mikrosatelit Bb22 byl polymorfní u všech druhů, zatímco Bb23 byl polymorfní pouze u buňáků. Počty testovaných jedinců ani alel autoři neuvádějí.

Moodley *et al.* (2015) popsali 25 polymorfních mikrosatelitních lokusů u buňáka útlozobého. U lokusu Pacbel\_07265 autoři našli 15 alel při  $T_a$  56 °C, zatímco já jsem u tohoto lokusu našla 5 alel při  $T_a$  56 °C a s tříčtvrteční koncentrací hořečnatých iontů. Také provedli *cross-species* PCR amplifikaci u 118 jedinců buňáka širokozobého, 79 jedinců buňáka holubího, 18 jedinců buňáka Salvinova, 35 jedinců buňáka hrdliččího, 99 jedinců buňáka modravého a 6 jedinců buňáčka Wilsonova. Lokus Pacbel\_07265 vykazoval polymorfismus u všech zástupců s počtem alel: 14 u buňáka širokozobého, 15 u buňáka holubího, 7 u buňáka Salvinova, 6 u buňáka hrdliččího, 28 u buňáka modravého a 5 u buňáčka Wilsonova.

Sun *et al.* (2009) charakterizovali 10 mikrosatelitních lokusů u buňáčka dlouhokřídlého a u buňáčka madeirského. Variabilitu testovali u 27 jedinců buňáčka madeirského, 22 jedinců buňáčka Monteirova a 24 jedinců buňáčka dlouhokřídlého při  $T_a$  50 °C. U lokusu Oc28B autoři našli 3 alely u buňáčka madeirského i Monteirova, zatímco u buňáčka dlouhokřídlého byl tento lokus monomorfní. Já jsem u tohoto lokusu detekovala 2 alely při  $T_a$  55 °C. Amplifikací lokusu Oc87B autoři získali 3 alely u buňáčka madeirského, 6 alel u Monteirova a 9 alel u dlouhokřídlého. Já jsem amplifikací tohoto lokusu našla 2 alely při  $T_a$  53 °C.

Bried *et al.* (2012) popsali 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů u buňáčka Monteirova. Při testování těchto lokusů použili stejnou  $T_a$  58 °C. Pro lokus Omn8 autoři detekovali 10 alel, já detekovala 6 alel při  $T_a$  61 °C. U lokusu Omn23 našli 4 alely, zatímco já jsem pro tento lokus detekovala 2 alely při  $T_a$  61 °C. Také provedli *cross-species* PCR amplifikaci u buňáčka madeirského, buňáka modravého a buňáka Bulwerova. Lokus Omn8 byl polymorfní pouze u buňáčka madeirského, u dalších dvou

druhů nedošlo k amplifikaci. Lokus Omn23 nebyl ani u jednoho ze zástupců polymorfní. Počty jedinců a alel autoři neuvádějí.

V laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci již mnoho studentů studovalo variabilitu mikrosatelitů od zástupců z řádu trubkonosí. Srovnání jednotlivých polymorfních mikrosatelitů je uvedeno v Tabulce č. 8.

Nedvědová (2015) se ve své diplomové práci zabývala *cross-species* PCR amplifikací u šesti nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) a našla 46 polymorfních mikrosatelitních lokusů se 2 až 5 alelami. Já jsem při testování čápa bílého našla 11 stejných polymorfních lokusů. Jednalo se o největší shodu v rámci porovnání s ostatními druhy.

Janušová (2015) ve své bakalářské práci provedla *cross-species* PCR amplifikaci u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) a našla 20 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Následně tyto polymorfní mikrosatelity charakterizovala ve své diplomové práci (Janušová, 2017) na 13 jedincích potápky roháče. Mikrosatelit Pc A107 ve své bakalářské práci uvedla jako polymorfní, ale po charakterizování byl označen jako monomorfní. Tři mikrosatelity byly shodné s mikrosatelity nalezenými u čápa bílého.

*Cross-species* amplifikací u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) se zabývala Verešová (2018) a z celkových 213 mikrosatelitů poskytlo polymorfní produkt pouze 12 se 2–3 alelami. Následně tyto mikrosatelity charakterizovala ve své diplomové práci (Verešová, 2020) na 41 jedincích pelikána kadeřavého. Ve srovnání s mnou testovanými lokusy nebyl ani jeden v její diplomové práci polymorfní.

U plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) provedla Strejčková (2016) *cross-species* PCR amplifikaci s 213 páry primerů a našla 51 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Lokus Puff G2C, který byl izolován z buřňáka baleárského byl vyhodnocen jako nehodnotitelný a pro další analýzy byl vyřazen. Tyto polymorfní mikrosatelitní lokusy následně testovala ve své diplomové práci (Strejčková, 2018) na 30 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského a detekovala 2 až 11 alel. Ve srovnání s polymorfními mikrosatelity u čápa bílého bylo 8 respektive 9 i s lokusem Puff G2C společných polymorfních.

Zlochová (2019) ve své diplomové práci charakterizovala 48 mikrosatelitních lokusů z řádu trubkonosí, které již dříve ve své bakalářské práci Kůrová (2017) určila jako polymorfní. Pro lokus Puff G2C nebylo možné určit genotyp a nebyl tedy hodnotitelný, proto pro další analýzu nebyl použit. Variabilita byla charakterizována u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Ve srovnání s čápem bílým vykazovalo shodu 6 (respektive 7) polymorfních lokusů.

Hudzieczková (2019) ve své bakalářské práci testovala variabilitu u šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a detekovala 42 polymorfních mikrosatelitních lokusů s počtem alel od dvou do šesti, 5 z nich je polymorfních u čápa bílého.

U pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) provedla Kopečná (2018) *cross-species* PCR amplifikaci s 213 páry primerů a našla 24 polymorfních mikrosatelitních lokusů se 2 až 3 alelami. Mikrosatelity De7, Parm05 a Ptero02 neposkytly žádný produkt. Zatímco při testování čápa bílého byly polymorfní. Následně tyto mikrosatelity použila ve své diplomové práci (Kopečná, 2020) a variabilitu charakterizovala na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Lokus PcA 107 ve své bakalářské práci uvedla jako polymorfní, při testování mikrosatelitů v rámci diplomové práce byl označen jako monomorfní. Já jsem při testování čápa bílého našla 2 stejné polymorfní lokusy jako ona u pelikána afrického.

Srovnáním 18 polymorfních mikrosatelitů testovaných u čápa bílého s ostatními druhy, které byly také pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovány na polymorfní mikrosatelity z řádu trubkonosí byla zaznamenána největší shoda s nesytem indomalajským, dále s plameňákem karibským a růžovým. Nejmenší shoda byla s pelikánem kadeřavým, kde byl nulový průnik polymorfismu. Mikrosatelit Omn8 byl polymorfní u 7 druhů s výjimkou pelikána kadeřavého, dále byl vysoce polymorfní i mikrosatelit Pc D103, který byl polymorfní u 5 druhů s výjimkou všech pelikánů. Naopak mikrosatelitní lokusy Paequ10 a Bb23 byly polymorfní pouze u čápa bílého (viz Tabulka č. 8).

**Tabulka č. 8:** Přehled polymorfních mikrosatelitních lokusů z řádu trubkonosí u čápa bílého (tato práce) a testy u dalších vybraných druhů z kladu Aequorlitorornithes: nesyta indomalajského (Nedvědová, 2015), plameňáka karibského (Strejčková, 2018), plameňáka růžového (Zlochová, 2019), pelikána bílého (Hudzieczková, 2019), potápky roháče (Janušová, 2017), pelikána afrického (Kopečná, 2020) a kadeřavého (Verešová, 2020). Číslem je označen počet alel, M - monomorfní lokus, U - polymorfní nehodnotitelný lokus, NA - žádná amplifikace. V závorce jsou uvedeny počty jedinců.

Lokus	Čáp bílý (6)	Nesyt indomalajský (6)	Plameňák karibský (30)	Plameňák růžový (22)	Pelikán bílý (6)	Potápka roháč (13)	Pelikán africký (12)	Pelikán kadeřavý (41)
Omn8	6	4	7	8	4	9	4	M
Pc D103	3	2	3	2	M	2	M	M
Bb22	2	2	2	2	M	M	M	M
Pacbel 07265	5	2	3	2	M	M	M	M
Oc28B	2	M	3	4	3	M	M	M
Puff G2F	2	2	3	3	M	M	M	M
Parm02	3	4	M	M	3	M	M	M
Ptero09	4	2	M	M	5	M	M	M
Pc A107	2	M	2	M	M	M	M	M
Omn23	2	2	M	M	M	M	2	M
De7	2	M	M	M	M	3	NA	M
Parm05	2	3	M	M	M	M	NA	M
Ptero02	4	5	M	M	M	M	NA	M
Ptero04	2	M	M	M	3	M	M	M
Puff G2C	3	3	U	U	M	M	M	M
Oc87B	2	M	2	M	M	M	M	M
Paequ10	2	M	M	M	M	M	M	M
Bb23	2	M	M	M	M	M	M	M

Čáp bílý byl v rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci celkově testován ve 4 pracích (Burianová, 2011; Fišerová, 2014; Gajdošíková, 2020 a tato práce). Dohromady bylo u čápa bílého testováno 615 mikrosatelitů z nichž polymorfismus vykazovalo 55, úspěšnost polymorfního produktu tedy činí 9 %. Testované mikrosatelity byly odvozené od zástupců z řádů: brodiví (Ciconiiformes), dlouhokřídli (Charadriiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), veslonozí (Pelecaniformes), potápky (Podicipediformes), trubkonosí (Procellariiformes) a tučňáci (Sphenisciformes). Z celkových 55 polymorfních lokusů u čápa bílého bylo již 18 plně charakterizováno (Burianová, 2011; Fišerová, 2014). Další 18 polymorfních mikrosatelitů z této práce a 19 z práce Gajdošíkové (2020) je zatím pouze vybráno a v blízké době by měly být plně charakterizované na 24 nepříbuzných jedincích čápa bílého.

## 7 Závěr

V rámci mé bakalářské práce jsem testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace celkově 213 párů primerů na šesti nepříbuzných jedincích čápa bílého. 207 z těchto párů primerů pocházelo od zástupců z řádu trubkonosí konkrétně 53 mikrosatelitů od druhů z čeledi albatrosovití, 100 od druhů z čeledi buňákovití a 54 od druhů z čeledi buňáčkovití. Zbývajících 6 mikrosatelitů pocházelo od druhů z řádu dlouhokřídlí (alkoun obecný, kulík mořský a racek novozélandský) a pěvci (lesňáček žlutorohý) a byly úspěšně pomocí *cross-species* PCR amplifikovány u některého druhu z řádu trubkonosí.

Z celkového počtu 213 párů primerů, 194 poskytlo u čápa bílého produkt monomorfní, 1 neposkytl žádný produkt (konkrétně se jednalo o Paequ2) a 18 mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních. Při počátečním testování byly všechny páry primerů amplifikovány při teplotě *annealingu* 50 °C. Následně pokud poskytl slabý produkt byla teplota snižována až na 44 °C, a naopak při silném produktu byla zvyšována až na 69 °C. U všech polymorfních mikrosatelitních lokusů jsem určila počet alel, délku elektroforetické separace, teplotu *annealingu* a genotyp. Počet alel se pohyboval od dvou do šesti. Největší počet alel (6) jsem zaznamenala u lokusu Omn8 pocházejícího od buňáčka Monteirova.

Nejvíce polymorfních lokusů se amplifikovalo od druhů z čeledi buňákovití a to 13. Největší počet polymorfních lokusů byl zaznamenán od buňáka havajského, konkrétně se jednalo o lokusy Ptero02, Ptero04 a Ptero09. Od čeledi albatrosovití byl zaznamenán pouze 1 polymorfní lokus a zbývajících 4 polymorfní mikrosatelitní lokusy pocházely od zástupců z čeledi buňáčkovití.

## 8 Literatura

Anděra, M. (2003): Fauna. Libri, Praha, 37–39.

Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and crossspecies amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuskript, dostupné online na: <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>, navštíveno dne 8. 2. 2021.

Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G. M., Bered, F., Fay, M. F., Lexer, Ch. (2007): Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Molecular Ecology, 16, 3759–3767.

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

Bouchner, M. (1986): Kapesní atlas ptáků. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 42–43.

Bried, J., Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuskript, dostupné online na: <https://www.yumpu.com/en/document/48view/39976169/eighteen-polymorphic-microsatellite-markers-in-monteiros-storm>, navštíveno dne 8. 2. 2021.

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

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

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

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

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

- Burianová, E. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Burnie, D. (Ed.) (2009): Zvíře. Knižní Klub, Praha, 277–279.
- Cracraft, J., Barker, F. K., Braun, M., Harshman, J., Gareth, J. D., Feinstein, J., Stanley, S., Cibois, A., Schikler, P., Beresford, P., García-Moreno, J., Sorenson, M. D., Yuri, T., Mindell, D. P. (2004): Phylogenetic Relationships among Modern Birds (Neornithes). Oxford University Press, New York, 468–489.
- Dawson D. A., Horsburgh G., Küpper C., Stewart I. R. K., Ball A. D., Durrant K. L., Hansson B., Bacon II., Bird S., Klein Á., Krupa A. P., Lee J.-W., Martín-Galvéz D., Simeoni M., Smith G., Spurgin L. G., Burke T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.
- Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Galvéz, D., Stewart, I. R. K., Horsburgh, G. J., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, A. W. J., Preston, S. A. J., Ekblom, R., Slate, J., Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*, 79, 506–514.
- Dubois, M. P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 905–907.
- Ellegren, H. (1992): Polymerase-Chain-Reaction (PCR) Analysis of Microsatellites: A New Approach to Studies of Genetic Relationships in Birds. Oxford University Press, New York, 886–895.
- Ellegren, H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, 435–445.
- Felix, J. (1977): Evropská fauna. Artia, Praha, 190–191.
- Fišerová, E. (2014): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*), černého (*C. nigra*) a simbila (*C. abdimii*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Friesen, V. L., González, J. A., Cruz-Delgado, F. (2006): Population genetic structure and conservation of the Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Conservation Genetics*, 7, 105–115.
- Gaisler, J., Zima, J. (2018): Zoologie obratlovců. Academia, Praha, 463–486.



- Gajdošíková, T. (2020): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Gibb, G. C., Kennedy, M., Penny, D. (2013): Beyond phylogeny: peleciform and ciconiiform birds, and long-term niche stability. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, 229–238.
- Gill, F., Donsker, D. (2021): IOC World Bird list (v11.1) dostupné online na: <https://www.worldbirdnames.org/bow/storks/>, navštíveno dne 16. 2. 2021.
- Given, A. D., Mills, J. A., Baker, A. J. (2002): Isolation of polymorphic microsatellite loci from the red-billed gull (*Larus novaehollandiae scopulinus*) and amplification in related species. *Molecular Ecology Notes*, 2, 416–418.
- Goldstein, D. B., Pollock, D. D. (1997): Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. *The Journal of Heredity*, 88, 335–342.
- Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwaters, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1044–1046.
- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K., Harshman, J., Huddleston, Ch. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, Ch. C., Yuri, T. (2008): A Phylogenetic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science*, 320, 1763–1767.
- Hanzák, J. (1974): Velký obrazový atlas ptáků. Artia, Praha, 74–77.
- Hanzák, J., Hudec, K. (1963): Světem zvířat II. díl-Ptáci (1. část). Státní nakladatelství dětské knihy, Praha, 124–128.
- Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2013): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources*, 5, 27–29.
- Hernandez, L. D., Lounsbury, Z. T., Collins, P. W., Henry, R. W., Newsome, S. D., Sacks, B. N. (2014): Development and characterization of 15 polymorphic microsatellite markers for North Pacific albatrosses using paired-end Illumina shotgun sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 6, 491–493.
- Hudzieczková, A. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Janušová, D. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

- Janušová, D. (2017): Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequirornithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kopečná, K. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kopečná, K. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Küpper, C., Horsburgh, G. J., Dawson, D. A., French-Constant, R., Szekely, T., Burke, T. (2007) Characterization of 36 polymorphic microsatellite loci in the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) including two sex-linked loci and their amplification in four other *Charadrius* species. *Molecular Ecology Notes*, 7, 35–39.
- 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.
- Kůrová, V. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Lacina, D., Rejman, B. (2002): Action plan for the White Stork (*Ciconia ciconia*) guidelines for species management in the Czech Republic. *Sylvia*, 38, 113–123.
- Lawrence, H. A. (2008): Conservation Genetics of the World's Most Endangered Seabird, the Chatham Island Tāiko. Disertační práce. Auckland, Nový Zéland, Massey University, dostupné online na: <http://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>, navštíveno dne 8. 2. 2021.
- Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimanda, G. K., Thali, M. R., Alderman, R., Cuthbert, R. J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Phillips, R. A., Ryan, P. G., Suazo, C. G., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046–1058.
- Nedvěďová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Neff, B. D., Gross, M. R. (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*, 55, 1717–1733.

- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153, 367–373.
- Sheldon, F. H., Slikas, B. (1997): Advances in Ciconiiform Systematics 1976–1996. *Colonial Waterbirds*, 20, 106–114.
- Sia, E. A., Butler, C. A., Dominska, M., Greenwell, P., Fox, T. D., Petes, T. D. (2000): Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 250–255.
- Sibley, Ch. G., Ahlquist, J. E., Monroe, Jr. B. L. (1988): A classification of the Living Birds of the World Based on DNA-DNA Hybridization Studies. *The Auk: Ornithological Advances*, 105, 409–423.
- Slikas, B. (1997): Phylogeny of the Avian Family Ciconiidae (Storks) Based on Cytochrome b Sequences and DNA-DNA Hybridization Distances. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8, 275–300.
- Slikas, B. (1998): Recognizing and Testing Homology of Courtship Displays in Storks (Aves: Ciconiiformes: Ciconiidae). *Society for the Study of Evolution*, 884–893.
- Strand, M., Prolla, T. A., Liskay, R. M., Petes, T. D. (1993): Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 365, 274–276.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řád trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Strejčková, B. (2018): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů od trubkonosých u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.
- Svensson, L., Grant, P. J. (2004): Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého východu. Praktická určovací příručka. Svojtka & Co., Praha, 34.

- Škorpíková, V., Reiter, A., Valášek, M., Křivan, V., Pollheimer, J. (2012): Ptáci Národního parku Podyjí / Thayatal Die Vögel des Nationalparks Podyjí / Thayatal. Správa Národního parku Podyjí, Znojmo, 97–99.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004) Characterization of microsatellite loci in White-chinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes*, 4, 33–35.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Verešová, D. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Verešová, D. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) a u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Veselovský, Z. (1987): Ptáci a voda. Academia, Praha, 26–28.
- Wang, X., Clarke, J. A. (2014): Phylogeny and forelimb disparity in waterbirds. *Evolution*, 2847–2860.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 581–584.
- Zlochová, A. (2019): Amplifikace vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.