

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



**Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species*  
mikrosatelitů u potápky roháče (*Podiceps cristatus*)**

**Diplomová práce**

**Bc. Jana Hoffmannová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2013**

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

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

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za odborné vedení, čas a trpělivost, kterou mi poskytl při zpracování experimentální i teoretické části mé diplomové práce. Dále bych za ochotu a pomoc chtěla poděkovat kolektivu Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci.

## SOUHRN

Tuto diplomovou práci jsem zpracovávala na téma analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u potápky roháče (*Podiceps cristatus*).

V teoretické části práce jsem se zabývala popisem čeledi potápkovitých, jakož i vlastního druhu potápky roháče, a jejímu fylogenetickému zařazení v rámci třídy ptáků. Dále jsem obecně vysvětlila pojem mikrosatelit a *cross-species* PCR amplifikace. Nakonec jsem charakterizovala mikrosatelitové lokusy vhodné pro testování u potápky roháče.

Pro potápku roháče nebyly doposud popsány žádné polymorfní mikrosatelitové lokusy, cílem experimentální části mé práce tedy bylo jejich nalezení pomocí *cross-species* PCR amplifikace. Celkově jsem otestovala 407 mikrosatelitových lokusů, které zahrnovaly všechny známé lokusy odvozené od zástupců řádů potápek, potáplíc, brodivých, veslonohých a plameňáků a dále několik vybraných lokusů odvozených od zástupců z řádů dlouhokřídlých, vrubozobých, tučňáků a sudokopytníků. Takto jsem našla 41 párů primerů amplifikujících 42 polymorfních lokusů (jeden pár primerů amplifikoval dva polymorfní lokusy). U všech lokusů jsem určila alelové konstituce na 13 nepříbuzných jedincích a následně je charakterizovala programy Cervus 3.0.3 a Genepop 4.1. Na základě těchto statistických dat jsem vybrala 4 polymorfní mikrosatelitové lokusy vhodné pro determinaci paternity u potápky roháče. Dále jsem u všech jedinců určila pohlaví a na základě toho detekovala 5 mikrosatelitových lokusů ve vazbě na pohlaví, z nichž jeden byl určitě, další tři pravděpodobně (bylo by možné potvrdit až po otestování většího počtu jedinců) vázané na chromozom Z a pátý se choval jako pohlavní marker.

## SUMMARY

I processed this master thesis on the topic of the analysis and characterization of polymorphic *cross-species* microsatellites in Great Crested Grebe (*Podiceps cristatus*).

In the theoretical part of my thesis I focused on describing the family Grebes, as well as its own species Great Crested Grebe, and its phylogenetic classification within the class of birds. I also explained the general term microsatellite and *cross-species* PCR amplification. Finally, I characterized microsatellite loci suitable for testing in Great Crested Grebe.

For Great Crested Grebe have not been described any polymorphic microsatellite loci yet, so the aim of the experimental part of my thesis was their finding using *cross-species* PCR amplification. Overall, I tested 407 microsatellite loci, which included all known loci derived from representatives of the orders grebes, loons, storks, pelecaniformes and flamingos as well as several selected loci derived from representatives of the orders charadriiformes, ducks, penguins and ungulates. Thus I found 41 primer pairs that amplified 42 polymorphic loci (one primer pair amplified two polymorphic loci). For all loci I identified allelic constitution in 13 unrelated individuals and subsequently characterized by the programs Cervus 3.0.3 and Genepop 4.1. Based on these statistical data, I chose four polymorphic microsatellite loci suitable for determination of paternity in Great Crested Grebe. I also determined sex in all individuals and based on of this I detected 5 sex-linked microsatellite loci, one of which was certainly, three more probably (it would be confirmed after testing a larger number of individuals) linked to chromosome Z and fifth acted as a marker for sex determination.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁLNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>9</b>
3.1	Čeď potápkovití.....	9
3.1.1	Potápka roháč .....	11
3.1.2	Fylogenetické vztahy čeledi potápkovitých.....	13
3.2	Mikrosatelity .....	15
3.2.1	<i>Cross-species</i> mikrosatelity .....	16
3.2.2	Mikrosatelity popsané u druhů z čeledi potápkovitých .....	17
3.2.3	Další vhodné mikrosatelity pro testování u potápky roháče.....	19
3.2.3.1	Mikrosatelity popsané u druhů z řádu plameňáci .....	19
3.2.3.2	Mikrosatelity popsané u druhu z řádu potáplíc .....	20
3.2.3.3	Mikrosatelity popsané u druhů z řádu veslonohých.....	21
3.2.3.4	Mikrosatelity popsané u druhů z řádu brodivých.....	24
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>30</b>
4.1	Biologický materiál.....	30
4.1.1	Izolace genomické DNA z krve.....	30
4.2	Mikrosatelity amplifikované u potápky roháče.....	31
4.2.1	PCR amplifikace.....	36
4.2.2	Elektroforetická separace PCR produktů.....	37
4.2.3	Statistické vyhodnocení výsledků.....	39
4.3	Seznam použitých chemikálií.....	39
4.4	Seznam použitých roztoků .....	40
4.5	Seznam použitých laboratorních přístrojů.....	43
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>57</b>
6.1	Polymorfni <i>cross-species</i> mikrosatelitové lokusy nalezené u potápky roháče.....	57
6.2	Určení pohlaví u potápky roháče a polymorfni lokusy ve vazbě na pohlaví.....	64
6.3	Úspěšnost <i>cross-species</i> PCR amplifikace v souvislosti s fylogenezí potápek.....	65
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>70</b>
<b>10</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>77</b>

# 1 ÚVOD

Mikrosatelity jsou tandemově opakované motivy jednoduchých sekvencí DNA vyskytující se ve všech eukaryotických i prokaryotických genomech. V důsledku vysoké úrovně polymorfizmu v počtu repetic jsou často používány jako genetické markery v populačně-genetických studiích, při studiích paternitních vztahů, ale i například ve forenzní DNA analýze. Izolace mikrosatelitových lokusů *de novo* je časově i finančně náročná, proto jsou pro příbuzné druhy levněji hledány pomocí *cross-species* PCR amplifikace již známých lokusů.

Potápka roháč (*Podiceps cristatus*) je zařazena v Červeném seznamu do kategorie zranitelných druhů, proto je důležité studovat její populace mimo jiné molekulárně-genetickými metodami. Úkolem této diplomové práce tedy bude nalezení doposud neexistujících polymorfních markerů u tohoto druhu pomocí *cross-species* PCR amplifikace všech dosud popsáných mikrosatelitových lokusů od zástupců z řádů potápek, potáplíc, brodivých, veslonohých, plameňáků a několika vybraných lokusů odvozených z řádů dlouhokřídlých, vrubozobých, tučňáků a sudokopytníků. Dále pak budu tyto lokusy charakterizovat pro následné použití ke studiu paternity a dalších populačních charakteristik u tohoto druhu.

## 2 CÍLE PRÁCE

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů a vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Otestování primerů amplifikujících mikrosatelitové lokusy, které jsou známé od taxonomicky příbuzných druhů ptáků, za účelem zjištění jejich polymorfizmu u potápky roháče.
3. Charakterizování polymorfních *cross-species* mikrosatelitových lokusů nalezených u potápky roháče.



## 3 LITERÁLNÍ PŘEHLED

### 3.1 Čeled' potápkovití

Čeled' potápkovitých (Podicipedidae) představují malí až středně velcí vodní ptáci velmi dobře přizpůsobení k plavání a potápění (Fjeldsá, 2004; Gaisler a Zima, 2007). Jejich velikost je značně rozmanitá, od malých druhů s délkou těla kolem 25 cm až po 75 cm u velkých druhů. Co se týče struktury těla, tvoří homogenní skupinu - mají špičatý zobák, spíše malou hlavu, štíhlý krk, krátké aerodynamické tělo, zakrnělý ocas a málo pneumatizované kosti (Hudec a kol., 1994; Fjeldsá, 2004). Vyznačují se jemným hustým opeřením a velkou kostrční žlázou (Gaisler a Zima, 2007).

Charakteristická je pro ně lemovaná noha, každý prst je samostatně vrouben širokým kožovitým lemem a sousední lemy srůstají jen při kořeni prstů (Hudec a kol., 1994; Gaisler a Zima, 2007). Navíc jsou jejich nohy v patě velmi pohyblivé, posazené značně dozadu těla a ve vodorovné pozici s povrchem vody (Hudec a kol., 1994; Fjeldsá, 2004). To jim umožňuje velkou obratnost a rychlost při pronásledování ryb a bezobratlých živočichů, jimiž se živí (Fjeldsá, 1994). Potápění jsou přizpůsobeni i fyziologicky, jejich tmavě červená barva svalů odráží silnou schopnost ukládat kyslík jako oxyhemoglobin a oxymyoglobin. Větší druhy se v moři dokážou potopit až do hloubky 40 m (Fjeldsá, 2004).

Potápkovití jsou jediní ptáci, kteří jsou schopni strávit celý život na vodě, staví si plovoucí hnízda z rostlinných částí ukotvená v jezerní vegetaci, tudíž nepotřebují ani v době hnízdění pevnou zem (Fjeldsá, 2004). Žijí v monogamii, jsou proslulí svým živým a pohyblivým tokem. Mnohé druhy mají v hnízdním šatě pestré zbarvení a na hlavě vztyčitelné pérové růžky a límce (Hudec a kol., 1994). Kladou nejčastěji 3-7 bíle zbarvených vajec. Mláďata jsou schopna ihned po vylíhnutí plavat. Kvůli nedokonalé termoregulaci však nesnesou dlouhodobý styk s vodou, proto se zpočátku vozí na zádech rodičů. Potrava je mláďatům lovena a zpočátku podávána do zobáku jejich rodiči, později jen předkládána, jedná se tedy o druhy polokrmivé (Hudec a kol., 1994).

Zástupci potápkovitých žijí ve stojatých vodách téměř na celém světě (Fjeldsá, 2004). Druhy hnízdící na severní polokouli odlétají zimovat na mořské břehy a jezera teplejších oblastí, druhy ve stabilních klimatických podmínkách žijí většinou na stejném území celoročně (Fjeldsá, 1994). Létají velmi rychle a přímočaře, ale z vody startují

dost ztěžka, musí se nejprve rozběhnout po hladině (Fjeldså, 1994; Gaisler a Zima, 2007).

Největším nebezpečím pro tyto vodní ptáky je ničení jejich přirozeného prostředí. V důsledku své mimořádné potravní specializace jsou velice citliví na změny v ekosystémech jezer. Škodí jim zejména znečišťování a vysoušení mělčin, na kterých hnízdí (Fjeldså, 1994).

K zvláštním zvykům čeledi potápkovitých patří polykání vlastního peří, které může zaplnit až polovinu objemu žaludku. Zátka z peří vytvořená v pyloru účinně brání průniku pevných částí kořisti do střev, což potvrzuje fakt, že obsah střev je tvořen jen tekutinou. Peří se také významně podílí na tvorbě vývržků (Fjeldså, 2004). Největší význam tohoto jevu tedy zřejmě spočívá v ochraně trávicího traktu před mechanickým poškozením ostrými kostmi pozřených ryb (Hudec a kol., 1994; Fjeldså, 2004).

Do čeledi potápkovitých podle Fjeldså (2004) patří 22 druhů zařazených do 7 rodů (české názvy uvedeny podle Anonymous (2006)): *Rollandia* (potápka Rollandova, potápka krátkokřídlá), *Tachybaptus* (potápka australská, potápka malá, potápka skořicovohrdlá, potápka madagaskarská, potápka nejmenší), *Podilymbus* (potápka americká, potápka obrovská), *Poliocephalus* (potápka šedohlavá, potápka novozélandská), *Podiceps* (potápka velká), *Podiceps* (potápka žlutorohá, potápka rudokrká, potápka roháč, potápka černokrká, potápka andská, potápka stříbřitá, potápka Taczanowského, potápka argentinská), *Aechmophorus* (potápka západní, potápka Clarkova; Sachs a Hughes (1999) uvádějí v přírodě se vyskytujícího křížence těchto dvou druhů – hybrid potápky západní/Clarkovy). Systematické zařazení čeledi potápkovitých podle Hudec a kol. (1994) a Gaisler a Zima (2007) je následující:

Říše: živočišná (Animalia)  
Kmen: strunatci (Chordata)  
Podkmen: obratlovci (Vertebrata)  
Třída: ptáci (Aves)  
Řád: potápky (Podicipediformes)  
Čeleď: potápkovití (Podicipedidae)

V České republice se vyskytuje pět druhů této čeledi, ale běžné jsou jen tři (Gaisler a Zima, 2007). Potápka malá (*Tachybaptus ruficollis*) je hojná na různých vodách, včetně malých nádrží, zimuje na nezamrzlých řekách. Potápka černokrká

(*Podiceps nigricollis*) hnízdí na větších rybnících a mělkých vodních nádržích s hustým porostem, u nás zimuje jen ojediněle. Největším druhem u nás je potápka roháč (*Podiceps cristatus*), která obývá větší vodní plochy s okrajovými porosty, v zimě nezamrzlé větší toky (Dungel a Hudec, 2001; Gaisler a Zima, 2007). V malém počtu a zřídka v ČR hnízdí a zimuje také potápka rudokrká (*Podiceps grisegena*) a potápka žlutorohá (*Podiceps auritus*) (Dungel a Hudec, 2001).

### 3.1.1 Potápka roháč

Potápka roháč (*Podiceps cristatus*) patří k větším ptákům obývajícím vodní prostředí, dorůstá délky 50 cm a váží kolem 1,2 kg; samice je o něco málo menší (Fjeldsá, 2004; Šťastný a kol., 2006). Vyznačuje se štíhlým krkem s dlouhým dýkovitým zobákem (Fjeldsá, 2004), ve svatebním šatu na hlavě prodlouženým černým peřím tvořícím růžky (dvojitou chocholku) a po stranách hlavy (na hrdle) hnědým peřím tvořícím límec. V prostém šatu je chocholka jen naznačená a límec sotva znatelný. Hřbet a šíje jsou hnědočerné, spodina těla a přední část krku svítivě bílá. U mláďat nejsou růžky ani límec vyvinuty a na tvářích jsou podélné tmavé proužky (Hudec a kol., 1994). Vzhled dospělých ve svatebním šatu a mláďete je vidět na Obr. 1.

**Obr. 1:** Rodiče a mládě potápky roháče (vlevo samec, vpravo samice).



(Zdroj: <http://www.mos-cso.cz/cz/galerie/album-dolezal>)

Hlavní potravu potápky roháče tvoří drobné ryby (okoun, ježdík, hrouzek, plotice apod.), početně hmyz a jeho larvy, měkkýši i jiní bezobratlí, vzácně žáby nebo užovky. Za potravou se převážně potápí, drobné členovce sbírá z vodní hladiny.

Vyskytuje se hojně v souvislém areálu v Evropě a Asii (nejpočetnější poddruh *Podiceps cristatus cristatus*), izolovaně v menších hnízdištích v Africe (poddruh *Podiceps cristatus infuscatus*) i v Austrálii a Novém Zélandu (poddruh *Podiceps cristatus australis*) (Hudec a kol., 1994; Fjeldsá, 2004; Šťastný a kol., 2006). V současné době žije v Evropě přes 300 000 párů a populace je charakterizovaná jako zabezpečená. Jedná se převážně o tažný druh, evropští ptáci zimují v přímořské oblasti Severního a Baltského moře nebo na Středozemním a Černém moři.

Potápky z ČR zimují ve Středomoří mezi Itálií a Skadarským jezerem, některé ojediněle zůstávají na našich nezamrzlých tocích. V období let 2001-2003 hnízdilo v ČR 2 500 až 5 000 párů potápky roháče, proti početnosti v roce 1989 jde o pokles téměř o 30 %. Příčiny snižování počtů jsou pravděpodobně v intenzivním rybníčním

hospodářství včetně úprav rybníků. Proto je v Červeném seznamu potápka roháč zařazena do kategorie zranitelného druhu (Šťastný a kol., 2006).

Většinou hnízdí v jednotlivých párech, vzácněji i v početných koloniích, v ČR jsou však známy jen menší kolonie (Hudec a kol., 1994). Preferují otevřené vodní plochy s okrajovými porosty (Fjeldsá, 2004). Na hnízdištích se objevují začátkem až koncem března a opouštějí je mezi koncem srpna až říjnem (Šťastný a kol., 2006). Ihned po přiletu začíná tok, který je u těchto potápek velmi ritualizovaný a složitý. Skládá se z různých fází, při kterých samice a samec potřásají hlavami, v zobácích vynášejí kousky vodních rostlin, čechrají si peří, potápějí se nebo se naopak vztyčují na vodě a vydávají při tom kvokavý zvuk *kök*. Také stavění hnízda je značně ritualizované a území v okolí hnízda si potápky hájí (výhružné a bojové postoje).

Tvoří monogamní páry a o mláďata pečují oba rodiče. Vejce snášejí na plovoucí hnízda, vytvořená ze zbytků vodních rostlin, ukotvená mezi rákosím prostřednictvím vodních rostlin, v zaplavených houštinách nebo i na klidné volné hladině. V ČR je běžné hnízdění jen jednou za rok, ale v jiných oblastech jsou poměrně běžná dvě, zřídka i tři hnízda (Hudec a kol., 1994; Fjeldsá, 2004). Velikost snůšky se pohybuje od 1 do 9 vajec, průměrně kolem 4 vajec (Fjeldsá, 2004).

### 3.1.2 Fylogenetické vztahy čeledi potápkovitých

Ačkoliv jsou evoluční vztahy mezi hlavními skupinami ptáků intenzivně studovány, výsledky jsou stále sporné. Pouze dva nody u základny evolučního stromu ptáků jsou současně podporovány jak molekulárně genetickými (DNA-DNA hybridizace, analýza mitochondriálních genomů, ribozomální RNA, exonových a intronových sekvencí), tak morfologicko fylogenetickými daty. První nodus rozděluje Paleognathae (běžci a tinamy) a Neognathae (ostatní ptáci). Druhý rozděluje Neognathae na Galloanserae (kur, kachna) a Neoaves (ostatní Neognathae).

Fylogeneze ptáků obecně souvisí s prostředím, ve kterém žijí. Nicméně adaptace vznikaly během evoluce evidentně několikrát, to vysvětluje, proč například mnoho ptáků žijících u vody není součástí kladu vodních ptáků (faetonovití, plameňáci, potápky) a naopak ptáci žijící na souši jsou zařazeni mimo klady suchozemských ptáků (turakovití, holubovití, stepokurovití, kukačkovití) (Hackett a kol., 2008). Příklady konvergentní evoluce můžeme najít v téměř každé adaptivní zóně. Například, jak potápkovití (Podicipedidae), tak potáplicovití (Gaviidae) jsou čeledi specializované

k lovení potravy pod vodou, mají tedy hodně společných charakteristik. Mají víceméně stejně špičaté zobáky, nohy posazené na konci aerodynamického téměř bezocasého těla a jejich kostry jsou nápadně podobné. Proto byli potápkovití a potáplicovití až do první poloviny 20. století zařazováni do stejného řádu. Až v roce 1925 byly zaznamenány první pochybnosti o vztahu potáplicovitých a potápkovitých vzhledem k odlišným jazykům navzdory podobnému složení potravy. Poté byly zjištěny další odlišnosti, jako různě formované některé části kostry nebo nohy opatřené plovací blánou u potáplicovitých na rozdíl od laločnaté nohy potápkovitých (Fjeldsá, 2004). Nyní se zdá, že jejich podobnost je výsledkem konvergentní evoluce, kdy se tyto skupiny nezávisle přizpůsobovaly potápivému způsobu života, nepatří tedy do stejné fylogenetické skupiny (Fjeldsá, 1994).

Vzestup molekulární biologie v posledních desetiletích otevřel nové cesty analýzám fylogenetických vztahů (Fjeldsá, 2004). Sibley a Ahlquist (1990) pomocí DNA-DNA hybridizace zjistili, že potápkovití představují mezi ostatními vodními ptáky velmi izolovanou linii a potáplicovité přemístili vedle trubkonosých a tučňáků. Další studie na tuto změnu ve fylogenetickém systému ptáků (oddělení potápkovitých od potáplicovitých) navazovaly.

Van Tuinen a kol. (2001) vyvrátili hypotézu o společném kladu kachnovitých (Anatidae) a plameňákovitých (Phoenicopteridae) a vytvořili společný klad plameňákovitých s potápkovitými (Podicipedidae). Použili k tomu sekvenční analýzy jaderných a mitochondriálních genomů i DNA-DNA hybridizační analýzy zástupců hlavních čeledí ptáků.

Plameňákovité jako sesterskou čeleď k potápkovitým (obě skupiny se vyvinuly ze společného předka, ale specializovaly se různým směrem, Fjeldsá, 2004) následně potvrdily další výzkumy: Mayr (2004), Ericson a kol. (2006), Hackett a kol. (2008). Plameňáci jsou dlouhonozí ptáci živící se drobnými organismy, které filtrují z vody, zatímco potápky se živí organismy, pro které se potápí pod vodu a jsou morfologicky velmi odlišné, sesterský vztah mezi těmito skupinami tedy poskytuje zajímavý příklad evoluce různých potravních strategií ptáků (Mayr, 2004).

Morfologickými podobnostmi mezi potápkami a plameňáky potvrdil Mayr (2004) jejich společný klad, když provedl kladistickou analýzu 70 morfologických znaků ze sedmnácti taxonů. Například pro plameňáky charakteristický humerus s výraznou oválnou prohlubeninou v místě úponu musculus scapulohumeralis cranialis byl taktéž pozorován u potápek.

Ericson a kol. (2006) použili genomickou DNA izolovanou ze vzorků krve nebo tkání 87 druhů Neaves reprezentujících 75 čeledí. Analýzou pěti genových oblastí DNA (*c-myc*, *RAG-1*, myoglobin,  $\beta$ -fibrinogen a ornitin dekarboxyláza) potvrdili společný klad plameňákovitých s potápkovitými.

Hackett a kol. (2008) použili pro svůj výzkum fylogenetických vztahů DNA sekvenci o délce 32 kbp z devatenácti nezávislých lokusů ze 169 druhů reprezentujících všechny hlavní skupiny ptáků. Na základě analytického zpracování získaných dat dospěli k řešení fylogenetického zařazení některých kontroverzních skupin, mimo jiné potvrdili, že potápky (Podicipediformes) a plameňáci (Phoenicopteriformes) tvoří sesterské skupiny.

## 3.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity, také známé jako repetice jednoduchých sekvencí DNA (*simple sequence repeats*, SSRs), jsou tandemově opakované motivy 1-6 bází (Zane a kol., 2002), podle Zhu a kol. (2000) motivy 2-5 bází, Richard a Pâques (2000) uvádějí 1-9 bází. Vyskytují se v kódujících, častěji v nekódujících oblastech všech dosud analyzovaných prokaryotických a eukaryotických genomů (Zane a kol., 2002). Z důvodu jejich vysokého polymorfizmu v počtu jednotlivých repetice a mendelistické dědičnosti jsou často používány jako genetické markery při studiích fylogenetické příbuznosti, struktury populací, forenzní DNA analýze a v neposlední řadě při genetickém mapování (Zhu a kol., 2000; Zane a kol., 2002, Faircloth a kol., 2009).

Vysoká úroveň polymorfizmu mikrosatelitových lokusů je způsobena vysokou mutační rychlostí, přičemž vyšší rychlost je prokázána v nekódujících oblastech genomu (Hardy a kol., 2002; Zane a kol., 2002). Počet repetice obvykle stoupá nebo klesá po jednotlivých repetitivních jednotkách (Zhu a kol., 2000). Čím větší je rozdíl ve velikosti mezi dvěma alelami, tím vyšší je počet mutačních událostí (časová prodleva), ke kterým došlo v průběhu evoluce od společného předka (Hardy a kol., 2002). Příčinou těchto mutací je převážně sklouznutí (*slippage*) DNA polymerázy během replikace (Zhu a kol., 2000).

Obvykle jsou mikrosatelitové lokusy *de novo* izolovány z parciálních genomických knihoven studovaného druhu screenováním tisíce klonů pomocí hybridizace se sondami obsahujícími repetice. Tato klasická strategie je však méně

užitečná například při práci s taxony s velmi nízkou frekvencí mikrosatelitů, jako jsou ptáci nebo rostliny. Proto se vyvíjejí modifikace postupu izolace, například hledání nových mikrosatelitů pomocí buď repeticí ohraničených náhodných primerů nebo použitím RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) primerů a následné Southernovy hybridizace produktů polymerázové řetězové reakce se sondami mikrosatelitů (Zane a kol., 2002). Dalším způsobem, jak zvýšit úspěšnost izolace nových mikrosatelitových lokusů například u ptáků je konstrukce o mikrosatelity obohacené genomické knihovny (Longmire a kol., 1999; McGuire a Noor, 2002).

Protože vývoj nových druhově specifických mikrosatelitových primerů je finančně a časově náročný, nově nalezené primery jsou úspěšně testovány pro mezidruhovou amplifikaci u příbuzných druhů (*cross-species* PCR amplifikace). Tímto způsobem lze získat užitečný soubor markerů bez jejich složité izolace pro každý druh zvlášť (Galbusera a kol., 2000).

### **3.2.1 *Cross-species* mikrosatelity**

Mikrosatelity patří v současné době mezi nejčastěji používané genetické markery v populačně biologických studiích. Nicméně, jeden z hlavních důvodů omezeného uplatnění mikrosatelitů je nedostatek univerzálních PCR primerů, které úspěšně amplifikují homologní produkty v rámci širokého spektra druhů. Ačkoli mikrosatelitové primery nelze obecně použít univerzálně, určitá úroveň PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů mezi blízkými příbuznými druhy je možná a označuje se jako *cross-species* PCR amplifikace.

Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů je negativní asociace s genetickou vzdáleností zdrojového a cílového druhu, což znamená, že jejich PCR amplifikace se snižuje s rostoucí genetickou vzdáleností (Primmer a kol., 1996; Primmer a kol., 2005). Podíl polymorfních lokusů mezi těmito markery naznačuje, že během evoluce jsou zachovávány pouze krátké repete (Primmer a kol., 1996). Od divergence zdrojového a cílového druhu ze společného předka se průměrná délka alel v jednotlivých lokusech vyvíjela nezávisle u obou druhů, Ellegren a kol. (1995) ve své práci uvádějí, že průměrná délka mikrosatelitového lokusu zdrojového druhu je vždy vyšší ve srovnání s průměrnou délkou stejného lokusu u cílového druhu. Vzhledem k tématu mé práce stojí za zmínku pozorování Barbará a kol. (2007), totiž, že pokles úspěšné *cross-species*



PCR amplifikace mezi rody v rámci čeledi je strmější u bezobratlých a ptáků ve srovnání s plazy a savci. Na druhou stranu však bylo u ptáků významné procento markerů úspěšně amplifikováno dokonce i mezi rozdílnými čeleděmi.

Mezi další faktory ovlivňující úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace patří podle Primmer a kol. (2005) teplota *annealingu* PCR reakce, kdy se při jejím snížení výrazně zvyšuje šance úspěšné *cross-species* PCR amplifikace. Dále, délka mikrosatelitu u zdrojového druhu (počet repetitivních jednotek) je v pozitivní korelaci s podílem cílových druhů, u kterých byl objeven polymorfismus. Například *cross-species* PCR amplifikující lokus obsahující dvacet a více repetitivních jednotek u zdrojového druhu měl v práci Primmer a kol. (2005) z 56 % větší pravděpodobnost odhalení polymorfismu u cílového druhu než lokus obsahující méně než deset repetitivních jednotek u zdrojového druhu. Počet repetitivních jednotek tedy může být považován za přesný indikátor lokusového polymorfismu.

Barbará a kol. (2007) mimo jiné zjistili, že na úspěch *cross-species* PCR amplifikovaných mikrosatelitů má vliv také rozmnožovací systém. Nižší úspěšnost PCR amplifikace byla prokázána především u samosprašných druhů rostlin, což může být vysvětleno větší pravděpodobností akumulací mutací (v důsledku malé efektivní velikosti populace) vedoucích ke konzervaci mikrosatelitových markerů. Způsob a míra změn v genomu u rostlin se však nápadně liší od živočichů. Barbará a kol. (2007) dále prokázali negativní efekt genomové velikosti (C hodnoty) na účinnost *cross-species* PCR amplifikace, to znamená, že amplifikace je vyšší u druhů, u kterých je velikost genomu nižší než u zdrojového druhu.

### **3.2.2 Mikrosatelity popsané u druhů z čeledi potápkovitých**

Doposud byly *de novo* izolovány mikrosatelity pouze od dvou druhů z čeledi potápkovitých (Podicipedidae), a to sice od potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*) a potápky západní (*Aechmophorus occidentalis*) (Sachs a Hughes, 1999; Humple, 2009).

Sachs a Hughes (1999) odvodili a charakterizovali sedm mikrosatelitových lokusů od potápky rudokrké (PgAAT1 až PgAAT41) s cílem prozkoumat evoluční role hnízdění v koloniích. Dále otestovali polymorfismus těchto lokusů na pěti jedincích pěti dalších druhů a jedné hybridní formě potápky, konkrétně u potápky černokrké

(*Podiceps nigricollis*), potápky žlutorohé (*Podiceps auritus*), potápky americké (*Podilymbus podiceps*), potápky západní (*Aechmophorus occidentalis*), potápky Clarkovy (*Aechmophorus clarkii*) a u hybrida potápky západní/Clarkovy (*Aechmophorus occidentalis/clarkii*). Všechny sedm mikrosatelitových lokusů bylo polymorfních u 87 jedinců potápky rudokrké se sedmi až osmnácti alelami na lokus a heterozygotností v rozsahu od 65 do 86 %. U ostatních testovaných druhů byla *cross-species* PCR amplifikace s navrženými primery méně účinná. Všechny lokusy byly polymorfní pouze u potápky žlutorohé s počty alel od tří do sedmi na lokus. U blízké příbuzné potápky černokrké byly naopak všechny lokusy monomorfní, což ale zřejmě souvisí s nízkou efektivní velikostí populace. U zbývajících testovaných druhů byly některé lokusy nehodnotitelné a u ostatních se počty alel pohybovaly od jedné do pěti na lokus. Tyto primery byly testovány na větším počtu jedinců (7-13) potápky západní a potápky Clarkovy také v rámci práce Humple (2009), kde bylo dosaženo srovnatelných výsledků.

Humple (2009) ve své diplomové práci izolovala jedenáct tetranukleotidových mikrosatelitových lokusů od potápky západní (B8 až G215) se záměrem studovat strukturu hnízdní populace v západní části Severní Ameriky. Těchto jedenáct mikrosatelitových lokusů otestovala i u potápky Clarkovy. Jak u zdrojového druhu potápky západní, tak u potápky Clarkovy byly všechny lokusy polymorfní s dvěma až deseti alelami na lokus. Hodnoty očekávané heterozygotnosti se pohybovaly v rozmezí 0,482-0,857 a hodnoty pozorované heterozygotnosti v rozmezí 0,188-0,875. Dále tento soubor mikrosatelitových lokusů testovala vždy na jednom jedinci pěti dalších druhů z čeledi potápkovitých, a to konkrétně u potápky rudokrké, potápky žlutorohé, potápky černokrké, potápky americké a potápky nejmenší (*Tachybaptus dominicus*). PCR amplifikace všech lokusů byla úspěšná (1 až 2 alely) alespoň na jednom testovaném druhu a pouze u potápky žlutorohé byly úspěšně amplifikovány všechny lokusy. U ostatních druhů poskytovala PCR reakce některých lokusů nehodnotitelné, popřípadě žádné produkty. Tyto výsledky však mají vzhledem k velmi nízkému počtu otestovaných jedinců (pouze 1) malou vypovídající hodnotu.

### **3.2.3 Další vhodné mikrosatelity pro testování u potápky roháče**

Jak jsem již uvedla v kapitole Fylogenetické vztahy čeledi potápkovitých, podle nejnovějších studií tvoří potápky a plameňáci sesterské skupiny. Ve zmiňované kapitole jsem také rozvedla problematický vztah potápek a potáplíc. Přesto, že jsou si tyto řády v mnohém podobné, Hackett a kol. (2008) umístili potáplíce do kladu vodních ptáků spolu s brodivými a veslonohými, zatímco potápky s plameňáky zařadili mimo tento klad do příbuznosti čeledi faetonovitých, což potvrzuje i studie Van Tuinen a kol. (2001), naopak jiná studie (Morgan-Richards a kol., 2008) uvádí jako sesterskou skupinu ke společnému kladu potápek s plameňáky dlouhokřídlé. Veslonohé a brodivé Hackett a kol. (2008) zařadili ve své fylogenetické studii do společného kladu, ve kterém dochází k promíchávání zástupců těchto dvou řádů. Umístění čeledi pelikánovitých (Pelecanidae) tradičně patřících do řádu veslonohých se zdá být s podporou nových molekulárních dat sporné, například Ericson a kol. (2006) je řadí k člunozobcovitým (Balaenicipitidae) a kladivoušovitým (Scopidae). Další změnou oproti klasickému systému ptáků je vyčlenění čeledi faetonovitých (Phaetontidae) z veslonohých, Van Tuinen a kol. (2001) je řadí jako sesterskou skupinu kladu potápek s plameňáky, kdežto Morgan-Richards a kol. (2008) je umísťují jako sesterskou skupinu k dravcům. V jiné studii McCormack a kol. (2013) zase uvádějí faetonovité jako sesterskou čeleď k slunatcovitým (Eurypygidae) z řádu krátkokřídlých (Gruiformes) a tyto dvě skupiny společně řadí jako sesterský klad k potápkám a plameňákům.

Na základě těchto fylogenetických vztahů potápek uvádím charakteristiku vhodných mikrosatelitových lokusů pro *cross-species* PCR amplifikaci u potápky roháče odvozených od zástupců z řádů plameňáci, potáplíce, veslonoží a brodiví.

#### **3.2.3.1 Mikrosatelity popsané u druhů z řádu plameňáci**

Doposud byly popsané mikrosatelity u dvou druhů z řádu plameňáci, a to sice u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*) (Preston, 2005; Kapil a kol., 2009; Drobek, 2010; Geraci a kol., 2010).

Z devíti polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených od plameňáka karibského uvedených v práci Kapila a kol. (2009), dva tvoří komplexní složené

repetice (Pru $\mu$ 3 a Pru $\mu$ 5) a ostatní (Pru $\mu$ 1, Pru $\mu$ 2 Pru $\mu$ 4, Pru $\mu$ 6, Pru $\mu$ 7, Pru $\mu$ 8 a Pru $\mu$ 9) čistě třínukleotidové repetice. Primery byly navrženy na základě sekvence klonů obsahujících mikrosatelity z parciální genomové knihovny získané z DNA přibližně šedesáti plameňáků žijících v Mexiku. Charakteristika těchto polymorfních lokusů byla provedena pomocí na PCR založené genotypizaci u 38 až 97 jedinců. Pozorovaná heterozygotnost byla v rozmezí od 0,12-0,91, všechny lokusy byly v Hardy-Weinbergově rovnováze, žádné lokusy nebyly ve vazbě a počet alel byl stanoven v rozmezí od 3 do 14 na lokus. Nicméně Drobek (2010) ve své diplomové práci dospěl k závěru, že 3 různé páry primerů navržené pro PCR amplifikaci lokusů Pru $\mu$ 7, Pru $\mu$ 8 a Pru $\mu$ 9 ve skutečnosti amplifikují pouze jeden lokus, tudíž od plameňáka karibského Kamil a kol. (2009) zřejmě izolovali pouze 7 mikrosatelitových lokusů. Další mikrosatelitový lokus (Pru $\mu$ 13) publikovala ve své dizertační práci Preston (2005), pro který genotypizací 39 jedinců plameňáka karibského našla 21 alel.

Pro *de novo* izolaci mikrosatelitových lokusů od plameňáka růžového použili Geraci a kol. (2010) DNA izolovanou z krve deseti mláďat z jedné hnízdní kolonie ve Francii. Po konstrukci čtyř parciálních genomických knihoven bylo vyizolováno 37 mikrosatelitových lokusů (PrA2 až PrD139). Pro jednotlivé lokusy byly určeny genotypy u 24-30 mláďat plameňáka růžového v rámci jedné hnízdní kolonie, počet alel se pohyboval mezi 2 až 33 na lokus, průměrná pozorovaná heterozygotnost byla 0,856, očekávaná 0,647, jen jeden lokus nebyl v Hardy-Weinbergově rovnováze a žádné lokusy nebyly ve vazbě. Nejméně alel (2) vykazovaly lokusy PrA111 a PrB2, nejvíce (33, 32) pak PrA105 a PrB102.

### **3.2.3.2 Mikrosatelity popsané u druhu z řádu potáplic**

McMillan a kol. (2004) popsali primery a podmínky PCR amplifikace sedmi mikrosatelitových lokusů (GimA9EPA až GimE11EPA), které izolovali z potáplice lední (*Gavia immer*). Primery testovali na 83 jedincích z deseti lokalit v Severní Americe, u jednotlivých lokusů našli dvě až sedm alel s pozorovanou heterozygotností v rozmezí 0,048 až 0,695.

### 3.2.3.3 Mikrosatelity popsané u druhů z řádu veslonohých

Z čeledi **faetonovitých (Phaetontidae)** byly *de novo* izolovány mikrosatelitové lokusy pouze od jednoho druhu (faetona žlutozobého, *Phaethon lepturus*).

Ke konstrukci genomické knihovny faetona žlutozobého pro izolaci mikrosatelitů použili Humeau a kol. (2010) DNA jednoho mrtvého jedince nalezeného na ostrově Réunion v Indickém oceánu. Objevili jedenáct mikrosatelitových lokusů (P3A3 až P4G1), pomocí kterých určili genotypy 55 jedinců, počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 38, nebyly zaznamenány žádné nulové alely, pozorovaná heterozygotnost byla mezi 0,06-0,91 a nebyla nalezena žádná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Podobnost teplot nasedání primerů (*annealingu*) mezi lokusy a široká škála velikosti fragmentů usnadňuje multiplex PCR, a tak může umožnit rychlé generování multilokusových genotypů potřebných pro studie struktury populace.

V rámci **čeledi kormoránovitých (Phalacrocoracidae)** bylo publikováno pět odborných článků popisujících mikrosatelitové lokusy odvozené od čtyř druhů.

Piertney a kol. (1998) popsali sedm mikrosatelitových lokusů (PcD 2 až PcT 4) pro kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), všechny se ukázaly být extrémě polymorfní (9 až 49 alel) u sta nepříbuzných jedinců. K prověření spolehlivosti těchto lokusů u jiných druhů veslonohých byly primery testovány na kormoránovi chocholátém, ušatém, modrookém (*Phalacrocorax triceps*) a poddruhu kormorána velkého (neboli kormoránovi černém, *Phalacrocorax c. novaehollandiae*). Všechny páry primerů, kromě PcD 4, poskytovaly PCR produkt požadované velikosti a byly polymorfní (2-11 alel na 5-20 jedincích), což naznačuje, že tyto primery mohou být užitečné pro populační studie i u příbuzných druhů.

U kormorána galapážského (*Phalacrocorax harrisi*) byly Duffiem a kol. (2008) *de novo* izolované mikrosatelitové lokusy PhB2 až PhG12. Genetická variabilita byla stanovena použitím nejméně 38 jedinců ze dvou populací, počet alel se pohyboval od 3 do 9 na lokus.

Fike a kol. (2009) našli u kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*) 24 polymorfních mikrosatelitových markerů (COR 01 až COR 47) s počty alel od 2 do 13. U tohoto kormorána pak Mercer a kol. (2010) popsali dalších 8 lokusů (Dcco-01 až Dcco-08), u kterých byla genetická variabilita hodnocena na šedesáti jedincích s počty alel mezi 2 až 17 na lokus. Dále byly všechny Dcco lokusy úspěšně amplifikovány

u dvou příbuzných druhů: kormorána západního (*Phalacrocorax penicillatus*) a kormorána mořského (*Phalacrocorax pelagicus*), nicméně počet alel ani počet testovaných jedinců autoři neuvádějí.

Barlow a kol. (2010) izolovali a charakterizovali deset polymorfních mikrosatelitových markerů pro kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*), mořského druhu vyskytujícího se endemicky v severovýchodním Atlantiku a ve Středozemním moři. Pět mikrosatelitů bylo tvořeno dinukleotidovými repeticemi (Phaari01 až Phaari06) a pět tetranukleotidovými repeticemi (Phaari08 až Phaari16), jejich charakterizace byla provedena na 40 jedincích ze severovýchodního Skotska a Korsiky. Počet alel na lokus byl stanoven mezi 1 až 15, pozorovaná úroveň heterozygotnosti mezi lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze byla v rozmezí od 0 do 0,89.

**Z čeledi fregatkovitých (Fregatidae)** byly izolovány mikrosatelitové lokusy pouze od jednoho druhu (fregatky obecné, *Fregata minor*).

Snížená heterozygotnost spojená s inbreedingem může snížit funkci imunitního systému, což může mít neblahé důsledky pro životaschopnost přirozené populace. K testování vztahu mezi inbreedingem a imunitními funkcemi je třeba znát míru příbuznosti mezi páry, rodokmenové údaje však bývají dostupné pouze pro krátce žijící organismy. Proto Dearborn a kol. (2008) vyvinuli mikrosatelitové markery pro měření genetické příbuznosti párů fregatky obecné – mořského ptáka dožívajícího se čtyřiceti i více let, u kterého dochází pravidelně k příbuzenskému křížení nejméně v jedné populaci. Mikrosatelitové lokusy byly izolovány z genomové knihovny zkonstruované z DNA jednoho samce a jedné samice fregatky obecné z ostrova Tern na Havaji. Polymorfismus pro 12 dinukleotidových (Fmin01 až Fmin12) a 6 tetranukleotidových (Fmin13 až Fmin18) mikrosatelitových lokusů byl stanoven u 23 jedinců fregatky (12 samců a 11 samic) z jedné populace na Havaji. Alelická diverzita se pohybovala v rozmezí od dvou do dvanácti s průměrnou pozorovanou heterozygotností 0,637 a nebyla prokázána žádná vazba na pohlaví. Tři lokusy (Fmin07, Fmin11 a Fmin16) vykazovaly vysokou homozygotnost, pravděpodobně kvůli nulovým alelám, a jeden pár lokusů (Fmin12 a Fmin18) vykazoval silnou genetickou nerovnováhu. Celkově tedy bylo nalezeno 14 mikrosatelitových lokusů použitelných pro studie příbuzenství a populační struktury.

V rámci **čeledi terejovitých (Sulidae)** byly publikovány čtyři odborné články popisující mikrosatelitové lokusy odvozené od tří druhů.

Terej modronohý (*Sula nebouxii*) je mořský pták žijící v koloniích, ač sociálně monogamní vykazuje intraspecifický hnízdní parazitismus a mimopárovou kopulaci. Pochopení evoluce mimopárového páření, párového chování a hnízdního parazitismu vyžaduje určení genetických rodičů a odhad příbuznosti mezi hnízdními páry. Pro tyto účely a také pro analýzu malých, izolovaných populací jaké tvoří modronozí terejové Faircloth a kol. (2009) popsali a charakterizovali jedenáct mikrosatelitových lokusů (BOOB-RM2-F07 až BOOB-RM4-G03), které otestovali na 31 jedincích odchycených na ostrově Isla Isabela v Mexiku. Počet alel na lokus se pohyboval od 3 do 22, všechny lokusy byly v Hardy-Weinbergově rovnováze a žádné lokusy nebyly ve vazbě.

Taylor a kol. (2010) izolovali další mikrosatelitové lokusy od tereje modronohého (Sn2A-36 až Sn2B-100) a tereje guánového (*Sula variegata*) (Sv2A-2 až Sv2B-138) pro jejich užitečnost v populačně-genetických studiích, zejména pro určení fylogenetické příbuznosti v rámci čeledi terejovitých. DNA pro konstrukci dvou genomických knihoven pro každý druh zvlášť byla získána izolací z krve tří jedinců tereje modronohého a tří jedinců tereje guánového z Peru. Z celkově dvaceti navržených párů primerů, bylo 16 spolehlivě amplifikováno u tereje modronohého nebo tereje guánového. Deset mikrosatelitových lokusů bylo polymorfních s informativní hodnotou aspoň u jednoho z terejů, 8 bylo polymorfních u tereje modronohého s 2 až 10 alelami na lokus a 9 bylo polymorfních u tereje guánového s 2 až 12 alelami na lokus. Pozorovaná heterozygotnost se pohybovala v rozmezí 0,29 až 0,84. Tyto výsledky byly získány genotypizací 24 jedinců tereje modronohého a 27 jedinců tereje guánového. Mikrosatelitové lokusy Sn a Sv mohou být také použity pro studium genetické struktury populace a hybridizace mezi terejem modronohým a guánovým. Dále byly tyto lokusy testovány na 4 až 14 jedincích tereje žlutohého (*Sula leucogaster*) se získanými počty alel od 1 do 10 na lokus.

15 mikrosatelitových lokusů (Ss1b-16 až Ss2b-153) bylo odvozeno od tereje červenonohého (*Sula sula*) (Morris-Pocock a kol., 2010). Průměrný počet alel na lokus byl na třiceti jedincích stanoven na 4,7 (2-11). *Cross-species* PCR amplifikace jedenácti lokusů byla provedena na 16 jedincích tereje modronohého a 4-8 jedincích tereje guánového s počty alel od 1 do 6 na lokus, u tereje guánového byly dva lokusy nehodnotitelné.

Z **čeledi pelikánovitých (Pelecanidae)** byly doposud popsány mikrosatelitové lokusy u dvou druhů, a to sice u pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*) a pelikána bílého (*P. onocrotalus*) (Hickman a kol., 2008; De Ponte Machado a kol., 2009).

Hickman a kol. (2008) našli pro pelikána severoamerického devět mikrosatelitových lokusů (PeEr 01 až PeEr 09), které testovali na 23 jedincích, všechny byly polymorfní s počtem alel na lokus od 2 do 8.

De Ponte Machado a kol. (2009) popsali mikrosatelitové markery pro studium rozsahu efektu hrdla láhve popsaného v západní Jižní Africe během padesátých let minulého století a k určení stupně genového toku mezi koloniemi u pelikána bílého. Izolovali deset mikrosatelitových lokusů (PEL086 až PEL304), které otestovali na celkově 46 jedincích pelikána bílého, 23 z Nambie a 23 z Jižní Afriky. Všechny lokusy byly polymorfní s počty alel od 2 do 19 na lokus, s pozorovanou heterozygotností mezi 0,261 až 0,913. Dva lokusy byly mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu (PEL185 u populace z Jižní Afriky a PEL221 u populace z Nambie). Žádný lokus nebyl ve vazbě. *Cross-species* PCR amplifikace byla úspěšná pro osm až deset lokusů u dalších tří pelikánů: pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), pelikána severoamerického a pelikána hnědého (*Pelecanus occidentalis*), s počtem alel pohybujících se od 1 do 6 na lokus.

#### **3.2.3.4 Mikrosatelity popsány u druhů z řádu brodivých**

V rámci **čeledi volavkovitých (Ardeidae)** bylo publikováno sedm odborných článků popisujících mikrosatelitové lokusy odvozené od pěti druhů.

Pro volavku velkou (*Ardea herodias*) vyvinuli McGuire a Noor (2002) primery pro PCR amplifikaci 17 mikrosatelitových lokusů (Ah 205 až Ah 630), u kterých detekovali variabilitu u zdrojového druhu, a které zkusili amplifikovat (počty alel ani počty testovaných jedinců autoři neuvádějí) u tří blízce příbuzných druhů: volavky bílé (*Ardea alba*), volavky popelavé (*Ardea cinerea*) a volavky jihoamerické (*Ardea cocoi*). Při genotypizaci čtyřiceti a více jedinců volavky velké bylo patnáct lokusů polymorfních a dva lokusy se zdály být monomorfní, ale vykazovaly variabilitu ve velikosti produktu mezi druhy v rámci rodu. Schopnost amplifikovat polymorfní produkty u blízce příbuzných druhů naznačuje, že jsou tyto markery užitečné i u jiných volavek, což potvrzuje studie Qing a kol. (2005), kteří testovali *cross-species* PCR



amplifikaci osmi těchto lokusů u dalšího zástupce volavkovitých. Genotypizací 67 jedinců kvakoše nočního dospěli k výsledkům – 6 lokusů bylo vysoce polymorfních (Ah 209, Ah 211, Ah 343, Ah 414, Ah 421 a Ah 522) s 8 až 18 alelami na lokus a dva lokusy (Ah 320 a Ah 526) méně polymorfní s 2 a 3 alelami na lokus. Navíc, Huang a Zhou (2011) testovali soubor těchto párů primerů na čápu východním (*Ciconia boyciana*), zástupci čeledi čápoovitých (Ciconiidae). Pomocí PCR amplifikace DNA z 23 jedinců našli u tohoto druhu 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených od volavky velké s počty alel od tří do jedenácti na lokus.

Chang a kol. (2009) použili pro izolaci markerů DNA izolovanou ze svalů kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*). Celkem charakterizovali 11 mikrosatelitových lokusů (nycti22 až nycti36) od tohoto druhu s průměrným počtem alel 7,5 (4-13) na lokus. Hodnoty pozorované heterozygotnosti se pohybovali od 0,25 do 1,00 a očekávané heterozygotnosti od 0,51 do 0,88. Žádné lokusy nebyly ve vazbě a jen jeden lokus nycti36 se významně odchyloval od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Jedenáct párů primerů bylo dále testováno *cross-species* PCR amplifikací u dalších jedenácti zástupců čeledi volavkovitých. Při stejných PCR podmínkách jako u zdrojového druhu byly lokusy nycti26 a nycti62 amplifikovány u všech druhů a lokusy nycti22, nycti68 a nycti15 u téměř všech druhů, u ostatních lokusů bylo taktéž detekováno vysoké procento úspěšné PCR amplifikace mezi druhy. Počty alel u amplifikovaných lokusů ani počty testovaných jedinců autoři neuvádějí.

Hill a Green (2010) izolovali a charakterizovali 12 nových polymorfních mikrosatelitových lokusů (Er21 až Er51) od volavky červenavé (*Egretta rufescens*). Genotypizaci provedli na 31 jedincích z jedné hnízdní kolonie v Texasu, počet alel se pohyboval od 2 do 10 na lokus. Dva lokusy (Er41 a Er23) nesplňovaly podmínky Hardy-Weinbergovy rovnováhy a z toho jeden lokus (Er41) pravděpodobně obsahoval nulové alely.

Huang a kol. (2010) izolovali 18 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Ae01 až Ae47) od volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) a otestovali je na dvaceti jedincích odchycených v provincii Fujian v Číně. Na tomto souboru detekovali na lokus 2 až 9 alel, lokus Ae25 se výrazně odchyloval od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a žádný pár lokusů nebyl ve vazbě. Pro výzkum univerzálnosti primerů primárně navržených pro volavku žlutozobou, byly tyto markery testovány na amplifikaci genomické DNA dalších pěti druhů volavek: volavky stříbřité (*Egretta garzetta*, n = 2), volavky pobřežní (*Egretta sacra*, n = 2), volavky bílé (*Ardea alba*, n = 2), volavky čínské (*Ardeola*

*bacchus*, n = 2) a volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*, n = 3). 18 lokusů vykazovalo různou míru úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace od 77,78% pro volavku pobřežní po 100% pro volavku stříbřitou a devět lokusů bylo amplifikováno u všech těchto druhů. Počty alel u amplifikovaných lokusů ani počty testovaných jedinců autoři neuvádějí.

Volavka rusohlavá (*Bubulcus ibis*) je invazivní druh na celém americkém kontinentu, pokračování její expanze ohrožuje původní druhy ptáků. Pochopení populační genetiky tohoto druhu je nezbytné pro monitorování populací a vývoj účinných strategií pro zastavení šíření. Campanini a kol. (2012) ve své práci prezentovali 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Bi01 až Bi30) s počtem alel od 2 do 4 na lokus. Tyto výsledky získali genotypizací 35 jedinců z kolonie na jihovýchodě Brazílie. Dále prověřili úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace se vzorky osmi druhů z čeledi volavkovitých, pro všechny druhy byly testy úspěšné u 7 lokusů (počty alel ani počty testovaných jedinců autoři neuvádějí), což dokazuje jejich potenciální užitečnost pro genetické studie s jinými volavkami.

V rámci **čeledi ibisovitých (Threskiornithidae)** bylo publikováno sedm odborných článků popisujících mikrosatelitové lokusy odvozené od čtyř druhů. Čeleď ibisovitých je rozdělována na dvě podčeledi, nejprve uvádím lokusy odvozené od zástupců **kolpíků** (koplík růžový, *Ajaia ajaja* a kolpík malý, *Platalea minor*) a posléze od zástupců **ibisů** (ibis čínský, *Nipponia nippon* a ibis rudý, *Eudocimus ruber*).

Koplík růžový je chován v mnoha zoologických zahradách v USA. Tento druh vytváří ve volné přírodě pravděpodobně monogamní svazky, avšak v zajetí bylo pozorováno mnoho mimopárových mláďat. Schopnost správně identifikovat genetickou příbuznost kolpíků je nutná k zajištění přenosu ptáků mezi zahradami s cílem maximálně zvýšit genetickou diverzitu v populaci, a tím zajistit genetickou zdatnost budoucího potomstva. Za tímto účelem Sawyer a Benjamin (2006) izolovali a charakterizovali pět polymorfních mikrosatelitových lokusů (Aaju1 až Aaju6) s počtem alel od tří do devíti na lokus a jeden na pohlaví vázaný mikrosatelitový lokus (Aaju4) z genomické DNA 61 kolpíků růžových ze tří zoologických zahrad a z jedné volně žijící populace. Polymorfismus lokusu Aaju4 byl omezen na dvě alely, jeho vazba na pohlaví byla jednoznačná, protože jedna alela byla spojená s W chromozomem samic a druhá s Z chromozomem, tento lokus je tedy mimořádně užitečný pro identifikaci pohlaví. Mikrosatelitové lokusy odvozené od kolpíka růžového byly také

použity Miňou a Del Lamou (2009) při vývoji metody izolace DNA pro genetické studie u populací vodních ptáků z vypelchaného peří. Tato neinvazivní metoda by mohla usnadnit odběr genetického materiálu od druhů hnízdících v nepřístupných lokalitách.

Kolpík malý patří k celosvětově ohroženým druhům, stejně jako mnoho zástupců řádu brodivých, s endemickým výskytem ve východní Asii. Yeung a kol. (2009) izolovali od tohoto druhu 23 mikrosatelitových markerů (PM1-4 až PM3-31). Na souboru 16 až 20 jedinců se počet alel pohyboval v rozmezí od dvou do devatenácti na lokus. Frekvence alel pěti lokusů se odchylovala od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a lokus PM2-20 byl pravděpodobně vázaný na Z chromozom, protože všichni homozygoti (hemizygoti) byly samice. Zbývajících 18 lokusů může poskytovat dostatečný soubor molekulárních markerů pro použití v ekologickém a konzervačně genetickém výzkumu těchto ohrožených druhů. Všechny primery byly také testovány na jednom jedinci u pěti dalších zástupců brodivých. Nicméně autoři pouze uvádějí, jestli PCR amplifikací vznikl produkt, ale nezmiňují případný polymorfismus.

Ibis čínský (*Nipponia nippon*) je kriticky ohrožený pták, jeho současná populace se vyvinula z posledních čtyř volně žijících jedinců objevených v roce 1981 v Číně. Vzhledem k vysokému stupni ochrany je značný zájem o vyhodnocování genetické diverzity a příbuznosti jedinců tohoto druhu. Za tímto účelem Ji a kol. (2004) popsali třináct mikrosatelitových lokusů (NnAD10 až NnNF5) na 107 jedincích ibise čínského. Z toho osm bylo polymorfních s méně než čtyřmi alelami (1-3) na lokus, což odráží výrazný efekt hrdla láhve u tohoto druhu. Páry primerů byly také testovány na třech příbuzných jedincích (sourozencích) ibise černohlavého (*Threskiornis melanocephalus*), amplifikace byla úspěšná u všech lokusů, z toho pět bylo polymorfních s 2 a 3 alelami. He a kol. (2006) uvádí jedenáct mikrosatelitových lokusů (Nn01 až Nn26) s větším polymorfizmem než Ji a kol. (2004) u ibise čínského s počty alel na lokus mezi 2 až 5. Tyto výsledky získali genotypizací 36 jedinců z volně žijící populace a z populace žijící v zajetí. Pět párů lokusů bylo ve vazbě (jeden u jedinců z volně žijící populace, ostatní u jedinců z populace chované v zajetí) a dále pět lokusů vykazovalo odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Heterozygotnost u populace z volné přírody nebyla výrazně rozdílná od heterozygotnosti jedinců chovaných v zajetí, což indikuje podobnou genetickou diverzitu těchto dvou populací. Mikrosatelitové lokusy odvozené od ibise čínského byly také testovány na polymorfismus u čápa východního, zástupce

čeledi čápovitých, avšak neúspěšně, všechny lokusy byly monomorfní (Huang a Zhou, 2011).

Santos a kol. (2006) prezentovali ve své práci 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Eru02 až Eru11) získaných od ibise rudého (*Eudocimus ruber*). Analýza na 45 jedincích ze tří brazilských přirozených populací ukázala alelickou diverzitu v rozmezí od tří do sedmnácti alel na lokus. Míra pozorované heterozygotnosti se významně lišila od Hardy-Weinbergovy rovnováhy u různých lokusů v každé populaci, jen lokus Eru10 byl v Hardy-Weinbergově rovnováze ve všech populacích. Tyto odchylky však mohly být způsobeny například fragmentací populace.

V rámci čeledi čápovitých (**Ciconiidae**) bylo publikováno pět odborných prací popisujících mikrosatelitové lokusy odvozené od tří druhů.

Tomasulo-Seccomandi a kol. (2003) izolovali 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů (WS $\mu$  03 až WS $\mu$  24) od nesýta lesního (*Mycteria americana*). PCR primery testovali na dvou populacích (11 jedincích z Brazílie a 10 jedincích z USA), kdy při genotypizacích poskytovaly dvě až čtyři alely na lokus. Vazebná nerovnováha byla detekována u jednoho páru lokusů (WS $\mu$  17 a WS $\mu$  18) u populace z USA. Některé z těchto primerů byly také testovány v jiných studiích. Shephard a kol. (2009) testovali tyto primery na *cross-species* PCR amplifikaci u čápa bílého, kde byla taktéž prokázána vazba lokusů WS $\mu$  17 a WS $\mu$  18, lokus WS $\mu$  03 byl zřejmě mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu a počet alel na lokus se pohyboval od dvou do tří na lokus. Drobek (2010) ve své diplomové práci dospěl k závěru, že 2 různé páry primerů navržené pro PCR amplifikaci lokusů WS $\mu$  17 a WS $\mu$  18 amplifikují pouze jeden lokus, což vysvětluje, proč byla v předchozích pracích detekovaná vazba mezi těmito dvěma lokusy. Od nesýta lesního Tomasulo-Seccomandi a kol. (2003) tedy zřejmě izolovali pouze 10 mikrosatelitových lokusů. Dále Wang a kol. (2011) testovali tyto primery u čápa východního, kde byly všechny tři testované lokusy (WS $\mu$  13, WS $\mu$  17 a WS $\mu$  18) polymorfní s třemi až pěti alelami na lokus. Nízká úroveň polymorfizmu těchto markerů odvozených od nesýta lesního je v souladu s předešlou studií Van Den Bussche a kol. (1999), ve které analýzou izolovaných čtyř mikrosatelitových lokusů (WS1 až WS6) taktéž od nesýta lesního odhalili nízkou úroveň alelové diverzity (průměrný počet alel na lokus 2,2) mezi 136 genotypovanými jedinci z devíti kolonií v USA a nízkou genetickou divergencí mezi těmito koloniemi.

Čáp bílý (*Ciconia ciconia*) v současné době hnízdí v celé Evropě, ale ve 30. až 40. letech minulého století prodělaly jeho populace výrazné demografické změny kvůli úpravám biotopů, zintenzivnění zemědělství a následné reintrodukci. Shephard a kol. (2009) identifikovali sedm mikrosatelitových markerů (Cc01 až Cc07) od tohoto druhu za účelem použití v populačních studiích. Analýza populace o třiceti jedincích odhalila dvě až deset alel na lokus. Páry primerů mikrosatelitových lokusů od čápa bílého byly také testovány ve studii Huanga a Zhou (2011) na *cross-species* PCR amplifikaci u čápa východního (*Ciconia boyciana*). Po provedení genotypizace na 23 jedincích bylo identifikováno pět těchto lokusů jako polymorfních s počty alel mezi 4 a 10 na lokus.

Wang a kol. (2011) navrhli pro konzervační genetické studie osm mikrosatelitových párů primerů (Cbo102 až Cbo235) od čápa východního (*Ciconia boyciana*). Všechny lokusy byly polymorfní kromě lokusu Cbo235, který byl homozygotní u všech 23 testovaných jedinců. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 8. Lokusy Cbo133 a Cbo235 byly mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu a pravděpodobně obsahovaly nulové alely.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál (krev) z třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) odchycených na rybnících střední Moravy byl pro účely mé diplomové práce poskytnut pracovníky Ornitologické stanice v Přerově (ORNIS).

Krev o objemu 20-100  $\mu$ l byla standardně odebrána z křídelní žíly, smíchána s 1 ml Queen's pufrou a uchována při 4 °C pro následnou izolaci DNA.

#### 4.1.1 Izolace genomické DNA z krve

Postup fenol-chloroformové izolace genomické DNA pro PCR z krve ptáků byl převzatý od Maniatis a kol. (1982) a upravený pro podmínky Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci.

##### 1. den

K 500  $\mu$ l roztoku krve v Queen's pufrou jsem připipetovala 100  $\mu$ l roztoku proteinázy K (10 mg/ml), 100  $\mu$ l 10% roztoku SDS, promíchala jsem a nechala inkubovat přes noc za překlápění v termostatu při 37 °C.

##### 2. den

Ke směsi jsem přidala 300  $\mu$ l fenolu a 300  $\mu$ l chloroformu, zvortexovala a zcentrifugovala (2000 g, 2 minuty).

Vrchní fázi jsem odebrala do nové mikrozkušavky, připipetovala 600  $\mu$ l chloroformu, zvortexovala a zcentrifugovala (2000 g, 2 minuty). Vrchní fázi jsem opět odebrala a zopakovala tento krok ještě jednou.

K odebranému roztoku jsem přidala 150  $\mu$ l octanu sodného (3 mol/l) a mikrozkušavku doplnila izopropanolem. Promíchala jsem a uložila na 2 hodiny do -20 °C.

Mikrozkušavky jsem poté centrifugovala (13 000 g, 30 minut). Izopropanol jsem slila, připipetovala 1 ml 70% ethanolu a centrifugovala (13 000 g, 15 minut).

Ethanol jsem opatrně slila a obsah mikrozkuřavky jsem nechala vysušit v termobloku (cca 1 hodinu při 55 °C).

K vysušené DNA jsem přidala 500 µl TE pufru a nechala rozpouštět přes noc za stálého překlápění v termostatu při 40 °C.

### 3. den

Pomocí přístroje NanoDrop jsem změřila koncentraci DNA a vzorky jsem uchovávala v -20 °C. Pro opětovné použití bylo potřeba DNA znovu rozpustit přes noc za neustálého překlápění v termobloku při 40 °C.

## 4.2 Mikrosatelity amplifikované u potápky roháče

PCR amplifikace jsem prováděla s primery pro mikrosatelitové lokusy, které byly dříve popsány jako polymorfní u zdrojových druhů. Konkrétně jsem použila všechny publikované mikrosatelitové lokusy existující pro zástupce z řádů potápek, potáplíc, brodivých, veslonohých a plameňáků a dále několik málo lokusů od dlouhokřídých, vrubozobých, tučňáků a sudokopytníků. Všechny mikrosatelitové lokusy, které jsem v rámci své diplomové práce testovala na polymorfismus u potápky roháče (*Podiceps cristatus*) jsou přehledně uvedeny v Tab. 1.

**Tab. 1:** Mikrosatelitové lokusy testované na polymorfismus u potápky roháče. Ve sloupcích tabulky je uveden řád, zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu a literární zdroj.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Potápky (Podicipediformes)	Potápka rudokrká ( <i>Podiceps grisegena</i> )	PgAAT1, PgAAT3, PgAAT6, PgAAT8, PgAAT25, PgAAT34, PgAAT41	Sachs a Hughes, 1999
	Potápka západní ( <i>Aechmophorus occidentalis</i> )	B8, B11, B102, B112b, B113, C5, E202, G118, G206, G209, G215	Humple, 2009
Potáplice (Gaviiformes)	Potáplice lední ( <i>Gavia immer</i> )	GimA9EPA, GimA12EPA, GimC5EPA, GimC11EPA, GimD9EPA, GimD12EPA, GimE11EPA	McMillan a kol., 2004

**Tab. 1:** Pokračování 1.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Brodiví (Ciconiiformes)	Kvakoš noční ( <i>Nycticorax nycticorax</i> )	nycti14, nycti15, nycti22, nycti26, nycti35, nycti36 nycti41, nycti43, nycti62, nycti68, nycti74	Chang a kol., 2009
	Volavka velká ( <i>Ardea herodias</i> )	Ah 205, Ah 208, Ah 209, Ah 210, Ah 211, Ah 212, Ah 217, Ah 320, Ah 341, Ah 343, Ah 414, Ah 421, Ah 517, Ah 522, Ah 526, Ah 536, Ah 630	McGuire a Noor, 2002
	Volavka žlutozobá ( <i>Egretta eulophotes</i> )	Ae01, Ae04, Ae05, Ae09, Ae13, Ae24, Ae25, Ae26, Ae27, Ae28, Ae30, Ae35, Ae36, Ae37, Ae38, Ae42, Ae44, Ae47	Huang a kol., 2010
	Volavka červenavá ( <i>Egretta rufescens</i> )	Er21, Er22, Er23, Er24, Er31, Er41, Ee42, Er43, Er44, Er45, Er46, Er51	Hill a Green, 2010
	Volavka rusohlavá ( <i>Bubulcus ibis</i> )	Bi01, Bi08, Bi13, Bi15, Bi18, Bi20, Bi22, Bi26, Bi28, Bi29, Bi30	Campanini a kol., 2012
	Kolpík růžový ( <i>Ajaja ajaja</i> )	Aaju1, Aaju2, Aaju3, Aaju4, Aaju5, Aaju6	Sawyer a Benjamin, 2006
		Aaju SEX	Podle Sawyer
	Kolpík malý ( <i>Platalea minor</i> )	PM1-4, PM1-13, PM1-17, PM2-14, PM2-16, PM2-20, PM2-21, PM2-28, PM2-29, PM2-37, PM2-62, PM2-68, PM2-80, PM3-13, PM3-15, PM3-16, PM3-17, PM3-20, PM3-22, PM3-25, PM3-28, PM3-29, PM3-31	Yeung a kol., 2009
	Ibis rudý ( <i>Eudocimus ruber</i> )	Eru02, Eru03, Eru04, Eru05, Eru06, Eru07, Eru08, Eru09, Eru10, Eru11	Santos a kol., 2006
Ibis čínský ( <i>Nipponia nippon</i> )	NnAD10, NnAF4, NnBF7, NnCE11, NnCG3, NnDD9, NnEA9, NnEB12, NnEH10, NnGF4, NnHB12, NnLF11, NnNF5	Ji a kol., 2004	



**Tab. 1:** Pokračování 2.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Brodiví (Ciconiiformes)	Ibis čínský ( <i>Nipponia nippon</i> )	Nn01, Nn03, Nn04, Nn12, Nn16, Nn17, Nn18, Nn21, Nn23, Nn25, Nn26	He a kol., 2006
	Čáp bílý ( <i>Ciconia ciconia</i> )	Cc01, Cc02, Cc03, Cc04, Cc05, Cc06, Cc07	Shephard a kol., 2009
		CC1, CC3, CC7, CC9, CC10, CC13	Segelbacher, osobní sdělení
	Čáp východní ( <i>Ciconia boyciana</i> )	Cbo102, Cbo108, Cbo109, Cbo121, Cbo133, Cbo151, Cbo168, Cbo235	Wang a kol., 2011
	Nesyt lesní ( <i>Mycteria americana</i> )	WS1, WS2, WS4, WS6	Van Den Bussche a kol., 1999
WS <sub>μ</sub> 03, WS <sub>μ</sub> 08, WS <sub>μ</sub> 09, WS <sub>μ</sub> 13, WS <sub>μ</sub> 14, WS <sub>μ</sub> 17, WS <sub>μ</sub> 18, WS <sub>μ</sub> 19, WS <sub>μ</sub> 20, WS <sub>μ</sub> 23, WS <sub>μ</sub> 24		Tomasulo- Seccomandi a kol., 2003	
Veslonoží (Pelecaniformes)	Faeton žlutozobý ( <i>Phaethon lepturus</i> )	P3A3, P3A4, P3C1, P3D7, P3F3, P3F5, P3F7, P3G12, P3H10, P4F2, P4G1	Humeau a kol., 2010
	Kormorán chocholatý ( <i>Phalacrocorax aristotelis</i> )	Phaari01, Phaari02, Phaari03, Phaari05, Phaari06, Phaari08, Phaari11, Phaari12, Phaari14, Phaari16	Barlow a kol, 2010
		Phaari04, Phaari07, Phaari09, Phaari13, Phaari15, Phaari17	Podle Barlow
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	COR 01, COR 03, COR 05, COR 06, COR 07, COR 12, COR 15, COR 17, COR 19, COR 20, COR 21, COR 22, COR 23, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 35, COR 38, COR 40, COR 41, COR 43, COR 45, COR 47	Fike a kol., 2009
Dcco-01, Dcco-02, Dcco-03, Dcco-04, Dcco-05, Dcco-06, Dcco-07, Dcco-08		Mercer a kol., 2010	

**Tab. 1:** Pokračování 3.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Veslonoží (Pelecaniformes)	Kormorán velký ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )	PcD 2, PcD 4, PcD 5, PcD 6, PcT 1, PcT 3, PcT 4	Piertney a kol., 1998
	Kormorán galapážský ( <i>Phalacrocorax harissi</i> )	PhB2, PhB4, PhB11, PhC11, PhD11, PhF12, PhG8, PhG12	Duffie a kol., 2008
	Fregatka obecná ( <i>Fregata minor</i> )	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18	Dearborn a kol., 2008
	Terej modronohý ( <i>Sula nebouxii</i> )	BOOB-RM2-F07, BOOB-RM3-D07, BOOB-RM3-F11, BOOB-RM4-A08, BOOB-RM4-B03, BOOB-RM4-C03, BOOB-RM4-D07, BOOB-RM4-E03, BOOB-RM4-E10, BOOB-RM4-F11, BOOB-RM4-G03	Faircloth a kol., 2009
		Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B-100	Taylor a kol., 2010
	Terej červenonohý ( <i>Sula sula</i> )	Ss1b-16, Ss1b-51, Ss1b-57, Ss1b-98, Ss1b-106, Ss1b-142, Ss2b-2, Ss2b-35, Ss2b-48, Ss2b-71, Ss2b-88, Ss2b-92, Ss2b-110, Ss2b-138, Ss2b-153	Morris-Pocock a kol., 2010
	Terej guánový ( <i>Sula variagata</i> )	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-95, Sv2A-152, Sv2B-27, Sv2B-138	Taylor a kol., 2010
	Pelikán bílý ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265, PEL304	De Ponte Machado a kol., 2009
	Pelikán severoamerický ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 07, PeEr 08, PeEr 09	Hickman a kol., 2008

**Tab. 1:** Pokračování 4.

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák růžový ( <i>Phoenicopus roseus</i> )	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139	Geraci a kol., 2010
	Plameňák karibský ( <i>Phoenicopus ruber</i> )	Pru $\mu$ 13	Preston, 2005
		Pru $\mu$ 1, Pru $\mu$ 2, Pru $\mu$ 3, Pru $\mu$ 4, Pru $\mu$ 5, Pru $\mu$ 6, Pru $\mu$ 7, Pru $\mu$ 8, Pru $\mu$ 9	Kapil a kol., 2009
Dlouhokřídlí (Charadriiformes)	Alkounek drobný ( <i>Aethia pygmaea</i> )	Apy06, Apy07	Dawson a kol., 2005
Vrubozobí (Anseriformes)	Kachna divoká ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	APH07, APH09	Maak a kol., 2000
		APH08, APH12, APH13, APH16	Maak a kol., 2003
	Kachna pižmová ( <i>Cairina moschata</i> )	CmAAT16, CmAAT35, CmAAT38	Stai a Hughes, 2003
	Kachnice laločnatá ( <i>Biziura lobata</i> )	Blm1, Blm10, Blm12	Guay a Mulder, 2005
	Kajka mořská ( <i>Somateria mollissima</i> )	Smo10	Paulus a Tiedmann, 2003
Tučňáci (Sphenisciformes)	Tučňák kroužkový ( <i>Pygocelis adeliae</i> )	AM13	Roeder a kol., 2001
Sudokopytníci (Artiodactyla)	Pratur indický, zebu ( <i>Bos indicus</i> )	HEL1	Lei a kol., 2005

Pozn. Pro určování pohlaví u potápky roháče jsem použila primery P2/P8 (Griffiths a kol., 1998) amplifikující homologní úseky dvou konzervativních genů *CHD* (*chromo-helicase-DNA-binding*) lokalizovaných na pohlavních chromozomech (*CHD-W* a *CHD-Z*).

#### 4.2.1 PCR amplifikace

Reakční směs pro PCR jsem připravila napipetováním jednotlivých položek do 1,5ml mikrozkušavky podle Tab. 2, poté jsem ji zvortexovala a krátce zcentrifugovala.

Do 0,2ml PCR zkumavek jsem napipetovala po 1  $\mu$ l roztoku izolované DNA z jednotlivých jedinců potápky roháče, následně jsem připipetovala 9  $\mu$ l připravené reakční směsi. Jednotlivé PCR zkumavky jsem vložila do termocykleru, průběh PCR reakce je uveden v Tab. 3.

**Tab. 2:** Složení PCR reakční směsi (pro 6 vzorků).

Položka reakční směsi	Pipetovaný objem [ $\mu$ l]
Deionizovaná voda	44,4
Reaction buffer A 10x	6,7
Roztok MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (20 $\mu$ mol/l)	0,7
Primer F (10 $\mu$ mol/l)	3,3
Primer R (10 $\mu$ mol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U/ $\mu$ l)	1,0

**Tab. 3:** Průběh PCR reakce.

Proces	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	94	5 min	1
Denaturace DNA	94	30 s	35
Nasedání primerů ( <i>annealing</i> )	50 (viz Pozn.)	30 s	
Prodlužování komplementárního řetězce DNA	72	30 s	
Závěrečné prodloužení	72	7 min	1

Pozn. Nejprve jsem provedla PCR reakce pro všechny testované mikrosatelitové lokusy s teplotou *annealingu* 50 °C. Následně jsem teplotu u polymorfních lokusů zvyšovala (popřípadě snižovala) za účelem co nejspecifičtějšího a dobře hodnotitelného produktu, ze kterého se dal odečíst přesný počet alel a genotypy u všech 13 testovaných jedinců (viz Tab. 4 ve Výsledcích).

## 4.2.2 Elektroforetická separace PCR produktů

Pro separaci PCR produktů jsem použila 6% polyakrylamidový gel za denaturačních podmínek. Postup přípravy gelu a elektroforetické separace byl optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

### **Příprava polyakrylamidového gelu:**

Velké sklo jsem vydrhla pomocí kartáčku, opláchla deionizovanou vodou a 96% ethanolem, ošetřila přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů a znovu opláchla deionizovanou vodou.

Malé sklo jsem vydrhla kartáčkem se saponátem, opláchla deionizovanou vodou a 96% ethanolem. Na sklo jsem aplikovala molekulární lepidlo. Po zaschnutí jsem sklo přetřela 96% ethanolem.

Na ošetřenou stranu velkého skla jsem na delší kraje položila 0,4 mm silné spacery, na které jsem ošetřenou plochou položila malé sklo. V místě spacerů jsem skla sepnula čtyřmi klipsy.

Připravila jsem polyakrylamidový gel, který jsem po důkladném promíchání opatrně nalila mezi připravená skla. V místě plnění prostoru mezi skly gelem jsem vsunula rovnou stranou hřebínek, v tomto místě jsem pak skla sepnula dalšími čtyřmi klipsy. Gel jsem nechala polymerizovat cca hodinu.

### **Vlastní elektroforetická separace PCR produktů:**

Po ztuhnutí gelu jsem odstranila klipsy a skla jsem důkladně umyla, usušila a upevnila v elektroforetické komůrce. Do katodového a anodového prostoru jsem nalila 0,5x TBE pufr. Hřebínek jsem vyjmula a prostor mezi skly jsem vyčistila pomocí proudu pufru z injekční stříkačky.

Elektroforetickou komůrku jsem připojila ke zdroji stejnosměrného napětí, na kterém jsem nastavila výkon na 90 W (hodnoty elektrického napětí i proudu byly konstantně nastaveny na maximum: 3000 V / 150 mA). Takto jsem gel nechala předehtřívát asi půl hodiny.

Během předehtřívání gelu jsem si připravila vzorky, které jsem posléze nanášela, smícháním roztoku PCR produktu s 5  $\mu$ l nanášecího pufru. Takto připravené vzorky jsem denaturovala po 3 minuty v termocykléru při 94 °C a ihned umístila do připravené ledové tříště, aby nedošlo k renaturaci.

Po ukončení předehtřívání gelu jsem odpojila elektrody a zdroj napětí. Ještě jednou jsem vyčistila prostor mezi skly pomocí proudu pufru a vsunula hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu. Poté jsem nanasla zdenaturované vzorky pomocí osmikanálové pipety po 2  $\mu$ l do prostor mezi zoubky hřebínku.

Elektroforetickou komůrku jsem opět připojila ke zdroji a snížila výkon na 70 W, takto jsem nechala vzorky separovat 80-180 minut podle molekulových hmotností dělených PCR produktů (mikrosatelitových lokusů).

### **Vizualizace PCR produktů po elektroforéze:**

Po uplynutí doby separace jsem odpojila zdroj napětí, vyjmula skla s gelem z elektroforetické komůrky a opatrně obě skla od sebe oddělila pomocí nože.

Malé sklo s gelem jsem vložila do fotomisky, zalila fix/stop roztokem a umístila na třepačku v digestoři. Po dvacetiminutovém působení fix/stop roztoku jsem jej slila zpět do baňky a gel promyla třikrát deionizovanou vodou.

Poté jsem gel ve fotomisce zalila 1% roztokem HNO<sub>3</sub>. Po pěti minutách třepání na třepačce jsem roztok slila a gel promyla čtyřikrát deionizovanou vodou.

Připravila jsem si roztok 0,1% dusičnanu stříbrného s formaldehydem, zalila s ním gel a nechala třepat. Po třiceti minutách jsem gel přemístila do deionizované vody asi na pět vteřin a následně ho umístila do druhé fotomisky.

Připravila jsem si vývojku, zalila s ní gel a nechala třepat na třepačce, dokud nedošlo k vizualizaci hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů, vyvíjení jsem zastavila zalitím fix/stop roztokem.

Po opláchnutí v deionizované vodě jsem nechala gel vysušit v sušárně. Gel byl následně vyhodnocen na negatoskopu, byly určeny polymorfnní mikrosatelitové lokusy, počty alel jednotlivých lokusů a genotypy jednotlivých jedinců.

Elektroforetogram byl naskenován a poté bylo sklo s gelem ponořeno na několik hodin do roztoku NaOH. Gel se působením NaOH odlepil a sklo bylo po umytí připraveno pro další použití.

### 4.2.3 Statistické vyhodnocení výsledků

Pro zpracování získaných genotypů byly použity dva populačně-genetické statistické programy (Cervus 3.0.3 a Genepop 4.1).

Pomocí programu Cervus 3.0.3 (Kalinowski a kol., 2007) byly pro polymorfní mikrosatelitové lokusy u potápky roháče stanoveny hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti, obsah polymorfní informace (vypovídací hodnota mikrosatelitového lokusu), pravděpodobnost výskytu nulových alel a to, zda lokus odpovídá Hardy-Weinbergově rovnováze. Program také udává spolehlivost při určování rodičovství a příbuzenských vztahů mezi jedinci.

Pomocí webové verze programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008) pak bylo zjištěno, jestli jsou nalezené polymorfní lokusy ve vazbě.

### 4.3 Seznam použitých chemikálií

- Akrylamid (AppliChem)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Clear Vue, Rain Repellent (Turtle WAX)
- 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) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)

- Chloroform (Lachema)
- Izopropanol (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema)
- Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová – ledová (Lachema)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)
- N, N'-methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Proteináza K (10 mg/ml) (Sigma)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

#### 4.4 Seznam použitých roztoků

##### 0,1% roztok dusičnanu stříbrného

- 800 ml deionizované vody
- 0,8 g dusičnanu stříbrného
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

##### 1% roztok kyseliny dusičné

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



#### 1 mol/l roztok hydroxidu sodného

- 40 g hydroxidu sodného
- doplnit deionizovanou vodou do 1 l

#### 10% roztok peroxodisíranu amonného

- 1 g peroxodisíranu amonného
- rozpustit v 10 ml deionizované vody
- uchovávat v chladničce

#### 6% polyakrylamidový gel

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 40 µl N, N, N', N'- tetramethylethylendiaminu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

#### Fix/Stop roztok

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

#### Molekulární lepidlo

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

#### Nanášecí pufr

- 0,125 g bromfenolové modře
- 0,125 g xyleneové modře
- 25 ml deionizované vody
- 100 ml formamidu

### Queen's pufr

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,8
- 2 ml zásobního roztoku NaCl (5 mol/l)
- 2,92 g ethylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA)
- 10 g N-lauroylsarkosinu
- rozpustit v 900 ml deionizované vody
- pH upravit na 7,5
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

### Vývojka

- 800 ml deionizované vody
- 24 g uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- vychladit na teplotu nižší než 10 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

### Zásobní 6% roztok akrylamidu

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 50 ml 10 x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N, N'- methylenbisakrylamid 19:1
- po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné lahvi v chladničce

### Zásobní 40% roztok akrylamidu : N, N'- methylenbisakrylamidu 19 : 1

- 380 g akrylamidu
- 20 g N, N'- methylenbisakrylamidu
- rozpustit v 500 ml deionizované vody
- objem doplnit na 1 l a uložit v temné lahvi v chladničce

### Zásobní roztok 10x TBE pufr

- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 55 g kyseliny borité H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>
- 40 ml roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

## 4.5 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  $\mu$ l (osmikanálová) a 0,3  $\mu$ l až 1 ml (ThermoLabsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu$ l až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific Ltd)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)
- Termocyklér GenePro (BIOER technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér XP Thermal Cyclers (BIOER technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)



[REDACTED]









[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]



## 6 DISKUZE

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]





[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

## 7 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsem u potápky roháče hledala polymorfní mikrosatelitové lokusy pomocí *cross-species* PCR amplifikace především od zástupců z řádů potápek, potáplic, brodivých, veslonohých a plameňáků, dále jsem testovala několik vybraných lokusů odvozených z řádů dlouhokřídlých, vrubozobých, tučňáků a sudokopytníků.

Z celkově testovaných 410 párů primerů jsem našla 41 párů amplifikujících celkem 42 polymorfních lokusů. U všech lokusů jsem genotypizací na 13 nepříbuzných jedincích potápky roháče a následnou analýzou získaných dat pomocí programu Cervus 3.0.3 určila jejich hlavní charakteristiky jako je počet alel, pozorovanou a očekávanou heterozygotnost, obsah polymorfní informace (vypovídající hodnotu mikrosatelitového lokusu), soulad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou a pravděpodobnost nulových alel. Pomocí programu Genepop 4.1 jsem dále zjistila, že žádná dvojice polymorfních mikrosatelitových lokusů není ve vazbě. Na základě těchto charakteristik a také dobré hodnotitelnosti rozdělených amplifikovaných mikrosatelitových lokusů v gelu jsem vybrala čtyři mikrosatelitové lokusy vhodné pro určování paternity a jiných příbuzenských vztahů v rámci populací potápky roháče.

U všech testovaných jedinců jsem určila pohlaví pomocí PCR amplifikace s primery P2/P8, u samců jsem pozorovala dvě alely různé délky, což bylo zřejmě způsobeno délkovým polymorfizmem intronů genu *CHD-Z*. U pěti mikrosatelitových lokusů jsem pak zaznamenala vazbu na pohlaví, jeden lokus byl s jistotou a tři lokusy byly pravděpodobně vázané na chromozom Z. Pátý lokus taktéž vykazoval vazbu na pohlaví, ale choval se jako pohlavní marker, to znamená, že všechny samice měly dvě alely (heterozygotní konstituce) a všichni samci jednu alelu (homozygotní konstituce).

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
bp	<i>base pairs</i> , páry bází
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
G	guanin
H <sub>Exp</sub>	<i>expected heterozygosity</i> , očekávaná heterozygotnost
H <sub>Obs</sub>	<i>observed heterozygosity</i> , pozorovaná heterozygotnost
CHD	<i>chromo-helicase-DNA-binding</i> protein
CHD-W	gen <i>CHD</i> lokalizovaný na pohlavním chromozomu W
CHD-Z	gen <i>CHD</i> lokalizovaný na pohlavním chromozomu Z
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
PIC	<i>polymorphic information content</i> , obsah polymorfní informace
RAPD	<i>randomly amplified polymorphic DNA</i> , náhodně amplifikovaná polymorfní DNA
RNA	ribonukleová kyselina
SSRs	<i>simple sequence repeats</i> , opakování jednoduchých sekvencí
T	tymin
T <sub>a</sub>	<i>annealing temperature</i> , teplota nasedání primerů

## 9 POUŽITÁ LITERATURA

- Anonymous (2006): Profil taxonu, čeleď potápkovití *Podicipedidae*. Publikováno on-line <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id8336/>, navštíveno dne 4. 5. 2013.
- 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.
- Barlow, E. J., Telford, A., Daunt, F., Cavers, S. (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*. Preprint.
- Campanini, E. B., Sanches, A., Hatanaka, T., Del Lama, S. N. (2012): Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from cattle egret (*Bubulcus ibis*) and cross-amplification in other Ardeidae species. *Conservation Genetics Resources* 4: 707-709.
- Dai, Y., Zhou, X., Fang, W., Lin, Q., Chen, X. (2013): Development and cross-species transferability of 23 microsatellite markers from the vulnerable Chinese Egret (*Egretta eulophotes*) using 454 sequencing. *Conservation Genetic Resources*, Preview-Only.
- Dawson, D. A., Darby, S., Hunter, F. M., Krupa, A. P., Jones, I. L., Burke, T. (2001): A critique of avian *CHD*-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. *Molecular Ecology Notes* 1: 201-204.
- Dawson, D. A., Hunter, F. M., Pandhal, J., Buckland, R., Parham, A., Jones, I. L., Bradshaw, M., Jehle, R., Burke, T. (2005): Assessment of 17 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5-15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes* 5: 289-297.
- De Ponte Machado, M., Feldhein, K. A., Sellas, A. B., Bowie, R. C. K. (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics* 10: 1033-1036.

- Dearborn, D. C., Hailer, F., Fleischer, R. C. (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources* 8: 1399-1401.
- Drobek, A. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Duffie, C., Glenn, T. C., Hagen, C., Parker, P. (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources* 8: 625-627.
- Dungel, J., Hudec, K. (2001): Atlas ptáků České a Slovenské republiky. Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Ellegren, H., Primmer, C. R., Sheldon, B. C. (1995): Microsatellite 'evolution': directionality or bias? *Nature Genetics* 11: 361-362.
- Ericson, P. G. P., Anderson, C. L., Britton, T., Elzanowski, A., Johansson, U. S., Källersjö, M., Ohlson, J. I., Parsons, T. J., Zuccon, D., Mayr, G. (2006): Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters* 2: 543-547.
- Faircloth, B. C., Ramos, A., Drummond, H., Gowaty, P. A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *Conservation Genetics Resources* 1: 159-162.
- Fike, J. A., Default, T. L., Rhodes, O. E. (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources* 9: 1183-1185.
- Fjeldså, J. (1994): Potáplice a Potápky. In: Homolová, Š. (Ed.): Obratlovci: savci, ptáci, obojživelníci, plazi: encyklopedický průvodce světem zvířat. Nakladatelský dům OP, Praha.
- Fjeldså, J. (2004): The Grebes (*Podicipedidae*). Oxford University Press, New York.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): Zoologie obratlovců. Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Galbusera, P., van Dongen, S., Matthysen, E. (2000): Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1: 163-168.

- Geraci, J., Gaillard, M., Bechet, A., Cezilly, F., Wattier, R. A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*. Preprint.
- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., Dawson, R. J. G. (1998): A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Guay, P.-J., Mulder, R. A. (2005): Isolation and characterization of microsatellite markers in musk duck (*Biziura lobata*: Aves) and their application to other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 5: 249-252.
- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, Ch. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, Ch. C., Yuri, T. (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* 320: 1763-1768.
- Hardy, O. J., Charbonnel, N., Fréville, H., Heuertz, M. (2002): Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. *Genetics Society of America* 163: 1467-1482.
- He, L.-P., Wan, Q.-H., Fang, S.-G., Xi, Y.-M. (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics* 7: 157-160.
- Hickman, C. R., Peters, M. B., Crawford, N. G., Hagen, C., Glenn, T. C., Somers, C. M. (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources* 8: 1439-1441.
- Hill, A., Green, M. C. (2010): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* 3: 13-15.
- Huang, X., Zhou, X., Chen, M., Fang, W., Chen, X. (2010): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics* 11: 1211-1214.
- Huang, Y., Zhou, L. (2011): Screening and application of microsatellite markers for genetic diversity analysis of Oriental White Stork (*Ciconia boyciana*). *Chinese Birds* 2: 33-38.
- Hudec, K. a kolektiv (1994): Fauna ČR a SR - Ptáci 1. Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.



- Humeau, L., Da Silva, D., Guérin, F., Jaquemet, S., Requier, J.-B., Le Corre, M. (2010): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Phaeton lepturus* (Phaethontidae). *Molecular Ecology Resources*. Preprint.
- Humple, D. L. (2009): Genetic structure and demographic impacts of oil spills in western and clark's grebe. Master's thesis, Sonoma State University, USA.
- Chang, Q., Xie, Z., Li, Q., Zhou, K. (2009): Microsatellite loci developed for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservation Genetics* 10: 1537-1539.
- Ji, Y.-J., Liu, Y.-D., Ding, C.-Q., Zhang, D.-X. (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4: 615-617.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. (2007): Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- Kapil, R., Sawyer, G. M., Preston, L., Benjamin, R. C. (2009): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*. Preprint.
- Lei, C.-Z., Fan, G.-L., Zhang, Y.-D., Qui, R.-B., Chen, H. (2005): Genetic polymorphism in a cultured population of the crested ibis *Nipponia nippon*. *Acta Zoologica Sinica* 51: 650-656.
- Longmire, J. L., Hahn, D. C., Roach, J. L. (1999): Low abundance of microsatellite repeats in the genome of the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*). *Journal of Heredity* 90: 574-578.
- Maak, S., Neumann, K., von Lengerken, G., Gattermann, R. (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics* 31: 233.
- Maak, S., Wimmers, K., Weigend, S., Neumann, K. (2003): Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 3: 224-227.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Mayr, G. (2004): Morphological evidence for sister group relationship between flamingos (Aves: Phoenicopteridae) and grebes (Podicipedidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 140: 157-169.
- McCormack, J. E., Harvey, M. G., Faircloth, B. C., Crawford, N. G., Glenn, T. C., Brumfield, R. T. (2013): A Phylogeny of Birds Based on Over 1,500 Loci Collected by Target Enrichment and High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 8: e54848.
- McGuire, H. L., Noor, M. A. F. (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes* 2: 170-172.
- McMillan, A. M., Bagley, M. J., Evers, D. C. (2004): Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). *Molecular Ecology Notes* 4: 297-299.
- Mercer, D. M., Haig, S. M., Mullins, T. D. (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources* 2: 119-121.
- Miño, C. I., Del Lama, S. N. (2009): Molted Feathers as a Source of DNA for Genetic Studies in Waterbird Populations. *Waterbirds* 32: 322-329.
- Morgan-Richards, M., Trewick, S. A., Bartosch-Härlid, A., Kardailsky, O., Phillips, M. J., McLenachan, P. A., Penny, D. (2008): Bird evolution: testing the Metaves clade with six new mitochondrial genomes. *BMC Evolutionary Biology* 8.
- Morris-Pocock, J. A., Taylor, S. A., Sun, Z., Friesen, V. L. (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources*. Preprint.
- Paulus, K. B., Tiedemann, R. (2003): Ten polymorphic autosomal microsatellite loci for the Eider duck *Somateria mollissima* and their cross-species applicability among waterfowl species (Anatidae). *Molecular Ecology Notes* 3: 250-252.
- Piertney, S. B., Goostrey, A., Dallas, J. F., Carss, D. N. (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology* 7: 133-140.
- Preston, E. L. (2005): Isolation and Characterization of Polymorphic Loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New Tools for Wildlife Management. Ph.D. dissertation, University of North Texas, USA.

- Primmer, C. R., Møller, A. P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.
- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo J. U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36: 348-360.
- Qing, Ch., Fa-Hua, C., Li-Feng, Z., Bao-Wei, Z., Kai-Ya, Z. (2005): Microsatellite variation and genetic diversity in the black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* in the lower reaches of Yangtze River. *Acta Zoologica Sinica* 51: 657-663.
- Richard, G.-F., Pâques, F. (2000): Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Reports* 1: 122-126.
- Riordan, J., Gardner, M. G., Fitch, A. J., Johnston, G. R. (2012): Isolation, via 454 sequencing, and characterisation of microsatellites for *Phalacrocorax fuscescens*, the blackfaced cormorant (Aves : Phalacrocoracidae). *Australian Journal of Zoology* 60: 340-342.
- Roeder, A. D., Marshall, R. K., Mitchelson, A. J., Visagathilagar, T., Ritchie, P. A., Love, D. R., Pakai, T. J., McPartlan, H. C., Murray, N. D., Robinson, N. A., Kerry, K. R., Lambert, D. M. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology* 10: 1645-1656.
- Rousset, F. (2008): GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- Sachs, J. L., Hughes, C., R. (1999): Characterization of microsatellite loci for red-necked grebes *Podiceps grisegena*. *Molecular Ecology* 8: 685-702.
- Santos, M. S., Gonçalves, E. C., Barbosa, M. S. R., Silva, A., Schneider, M. P. C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes* 6: 307-309.
- Sawyer, G. M., Benjamin, R. C. (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes* 6: 677-679.
- Shephard, J. M., Galbusera, P., Hellemans, B., Jusic, A., Akhandaf, Y. (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics* 10: 1525-1528.

- Sibley, C. G., Ahlquist, J. E. (1990): Phylogeny and classification of birds. A study in molecular evolution. Yale University Press, New Haven.
- Stai, S. M., Hughes, C. R. (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics* 34: 387-389.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (2006): Atlas hnízdního rozšíření ptáků v ČR 2001 – 2003. Aventinum, Praha.
- Taylor, S. A., Morris-Pocock, J. A., Sun, Z., Friesen, V. L. (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151: 525-528.
- Tomasulo-Seccomandi, A. M., Schable, N. A., Bryan, A. L., Brisbin, I. L., Del Lama, S. N., Glenn, T. C. (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3: 563-566.
- Van Den Bussche, R. A., Harmon, S. A., Baker, R. J., Bryan, A. L., Rodgers, J. A., Harris, M. J., Brisbin, I. L. (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the Wood Stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 116: 1083-1092.
- Van Tuinen, M., Butvill, D. B., Kirsch, J. A. W., Hedges, S. B. (2001): Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proceedings of the Royal Society B* 268: 1345-1350.
- Wang, H., Lou, X., Zhu, Q., Huang, Y., Zhou, L., Zhang, B. (2011): Isolation and Characterization of Microsatellite DNA Markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science* 28: 606-608.
- Yeung, C. K. L., Hsu, Y.-C., Yao, C.-T., Li, S.-H. (2009): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics* 10: 1081-1084.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zhu, Y., Strassmann, J. E., Queller, D., C. (2000): Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Conservation Genetics Resources* 76: 227-236.

## 10 PŘÍLOHY

The image shows a table with 10 rows and 2 columns. The entire content of the table is redacted with black bars. The table structure is as follows:

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

The image shows a table with a black header and a large black redacted area covering the main content. The table has a grid structure with multiple rows and columns. The header is a solid black bar at the top. The main body of the table is also black, indicating that the content has been redacted. The grid lines are visible on the left and right sides of the table.



[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]