

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species*
mikrosatelitů z kladu Aequorlitorhithes u potápky
roháče (*Podiceps cristatus*)**

Diplomová práce

Denisa Janušová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

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 trpělivost, ochotu a odborné vedení při zpracování teoretické i experimentální části mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci.

Souhrn

V rámci této diplomové práce jsem se věnovala testování a charakteristice vybraných polymorfních mikrosatelitů u potápky roháče (*Podiceps cristatus*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace.

V teoretické části jsem se zabývala obecným popisem řádu potápky (Podicipediformes), jeho rozdělením na jednotlivé druhy, výskytem těchto druhů a podrobnější charakteristikou potápky roháče. Další kapitoly jsem věnovala fylogenetickému zařazení potápkovitých v systému ptáků, mikrosatelitům, hledání nových mikrosatelitů pomocí jejich *de novo* izolace a *cross-species* PCR amplifikaci. Poté jsem popsala dosud otestované mikrosatelity u potápky roháče v rámci dvou bakalářských prací (Janušová, 2015; Filipová, 2016) a jedné diplomové práce (Hoffmannová, 2013), které vykazovaly polymorfismus. V neposlední řadě jsem popsala další potenciálně polymorfní mikrosatelity u studovaného druhu potápky.

V experimentální části jsem testovala třicet mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče, které dosud testovány nebyly a mohly by být polymorfní. Mikrosatelity, které projevily polymorfismus jsem společně s mikrosatelity označenými jako polymorfní v bakalářských pracech (Janušová, 2015; Filipová, 2016) vygenotypovala na třinácti jedincích potápky roháče a provedla jejich charakterizaci pomocí statistických programů Cervus 3.0.3 a Genepop 4.1.

Použitím metody *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů na DNA třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče a elektroforetické separace jsem charakterizovala celkem 42 polymorfních mikrosatelitů, s průměrným počtem alel na lokus 4,476. Šest mikrosatelitových lokusů pravděpodobně vykazovalo vazbu na pohlaví a žádné dva lokusy nebyly ve vazbě. Celkově tedy s dalšími nalezenými 42 mikrosatelity v diplomové práci (Hoffmannová, 2013) se jedná o 84 mikrosatelitů, které jsou použitelné pro populačně genetické studie u potápky roháče.

Summary

In this master thesis I dealt testing and characterization of polymorphic microsatellite selected from clade Aequorlitorhithes in Crested Grebe (*Podiceps cristatus*) using the method of cross-species PCR amplification.

In the theoretical part, I have dealt with the general description of the order of the Podicipediformes, its division into individual species, the occurrence of these species and the more detailed characteristics of Crested Grebe. Other chapters focused on phylogenetic classification of Grebes in the bird system, microsatellite, searching for new microsatellites using de novo isolation and cross-species PCR amplification. I then described the microsatellites tested in Crested Grebe in two bachelor theses (Filipová, 2016; Janušová, 2016) and one diploma thesis (Hoffmannová, 2013), which showed polymorphism, focusing mainly on the origin of these microsatellites and the results of the testing. Last but not least, I have described other potentially polymorphic microsatellites in Crested Grebe.

In the experimental section, I tested thirty microsatellites in six unrelated individuals that were not yet tested and could be polymorphic. Microsatellites that showed polymorphism, together with microsatellites found as polymorphic in bachelor theses (Janušová, 2015; Filipová, 2016), were genotyped on thirteen unrelated individuals and processed using statistical programs Cervus 3.0.3 and Genepop 4.1.

Using the method of cross-species PCR amplification of microsatellites on the DNA of thirteen unrelated individuals and electrophoretic separation, I characterized a total of 42 polymorphic microsatellites, totally 42 microsatellites in the diploma thesis (Hoffmannová, 2013), these are 84 microsatellites that are useful for studies of Crested Grebe.

Obsah

1.	Úvod.....	7
2.	Cíle práce	8
3.	Literární přehled	9
3.1.	Potápky	9
3.1.1.	Potápka roháč	11
3.2.	Fylogenetické zařazení potápkovitých v systému ptáků.....	13
3.3.	Mikrosatelity	15
3.3.1.	Hledání nových mikrosatelitů a <i>cross-species</i> PCR amplifikace.....	17
3.3.2.	Mikrosatelity polymorfní u potápky roháče.....	19
3.3.3.	Další potencionálně polymorfní mikrosatelity u potápky roháče.....	23
4.	Materiál a metody	24
4.1.	Biologický materiál.....	24
4.2.	PCR amplifikace	24
4.2.1.	Testování a charakterizace dosud netestovaných mikrosatelitů.....	26
4.2.2.	PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitů.....	26
4.3.	Elektroforetická separace PCR produktů.....	30
4.4.	Statistické hodnocení výsledků testování	32
4.5.	Seznam použitých chemikálií	33
4.6.	Seznam použitých roztoků.....	33
4.7.	Seznam použitých přístrojů	35
5.	Výsledky	37
6.	Diskuze	49
7.	Závěr	60
8.	Seznam použitých zkratk	61
9.	Použitá literatura	62
10.	Přílohy.....	76

1. Úvod

Potápka roháč je na seznamu ohrožených druhů a aby bylo možné ji podrobněji studovat, jsou zapotřebí genetické markery. Hoffmannová (2013) v rámci své diplomové práce charakterizovala 42 polymorfních mikrosatelitů, z nichž čtrnáct bylo odvozeno od zástupců řádu potápky, deset mikrosatelitů od zástupců řádu veslonozí, sedm mikrosatelitů od plameňáků, devět mikrosatelitů od brodivých a po jednom mikrosatelitovém lokusu od dlouhokřídlých a vrubozobých.

Já (Janušová, 2015) a Filipová (2016) jsme na její studium navázaly v rámci našich bakalářských prací a jelikož v rámci nejnovějších fylogenetických studií (Prum *et al.*, 2015) byla potápka roháč zařazena do kladu Aequirornithes, otestovaly jsme na DNA šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče mikrosatelity, které byly polymorfní u zástupců řádu trubkonosí, tučňáci a dále konzervované ptačí mikrosatelity a EST ptačí mikrosatelity.

Tato diplomová práce bude vycházet z výše uvedených bakalářských prací, přičemž v nichž popsané polymorfní mikrosatelity (celkem 39) budou amplifikovány u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče a následně charakterizovány. Dále budou na polymorfismus u šesti jedinců potápky roháče testovány další mikrosatelity pocházející od vybraných zástupců kladu Aequirornithes (28) a EST ptačí mikrosatelity (2), které doposud testovány nebyly, a pokud budou vykazovat polymorfismus, budou taktéž charakterizovány u třinácti jedinců potápky roháče pomocí statistických programů Cervus 3.0.3 a Genepop 4.1.

2. Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Otestování a charakterizace nových mikrosatelitů, které by mohly být polymorfní u potápky roháče a nebyly u ní doposud testovány, konkrétně dva EST ptačí mikrosatelity (Dawson *et al.*, 2010) a dále mikrosatelity pocházející od vybraných zástupců kladu Aequorlitorornithes. Jedná se o pět mikrosatelitů od marabu afrického (Ferrie *et al.*, 2013) a tři mikrosatelity od volavky žlutozobé z řádu brodiví (Dai *et al.*, 2015) a dále čtrnáct mikrosatelitů, které izoloval Bauer (2007) u plameňáka karibského a šest mikrosatelitů nalezených u plameňáka nejmenšího (Zaccara *et al.*, 2011), kdy oba druhy řadíme do řádu plameňáci.
4. PCR amplifikace mikrosatelitů na DNA třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče a jejich následná charakterizace. Jednalo se o mikrosatelity odvozené od zástupců řádu tučňáci a trubkonosí, které byly nalezeny jako polymorfní v rámci bakalářských prací Janušová (2015) a Filipová (2016) a mikrosatelity, které se testováním v této práci prokázaly jako polymorfní.

3. Literární přehled

3.1. Řád potápky

Potápky (Podicipediformes) jsou nevelký ptačí řád, jehož zástupci jsou dokonale přizpůsobeni k potápění a životu na vodě. Ve většině případů dosahují střední velikosti a od potáplíc se liší širším, menším tělem a delším tenkým krkem. Jejich opeření je velmi husté, na krku a břišní straně čistě bílé se spirálovitými paprsky (Gaisler *et Zima*, 2007), prachové peří vyrůstá jak na pernicích, tak na nažinách. Rýdovací pera jsou měkká, značně zkrácená a nijak neodlišená od ostatních ocasních per. Kostrční mazová žláza je porostlá peřím a mohutně vyvinutá (Hudec *et al.*, 1994). V hnízdním šatě se zbarvení opeření mění, což spolu s výraznými zvuky a vztyčitelnými pérovými růžky na hlavě hraje významnou roli při toku (del Hoyo *et al.*, 1992). Většina druhů má úzký zobák do špičky s ostrými okraji, s výjimkou rodu *Podilymbus*, kam řadíme například potápku šedou nebo potápku tlustozobou, jejichž zobáky jsou naopak silnější. Ocas potápek je zcela zakrnělý a nohy mají krátký, ze stran zploštělý běhák. Typickým znakem je nezvyklá anatomie plovací blány, přičemž každý prst je obklopen kožovitým lemem a lemy sousedních prstů jsou při jejich kořeni srostlé (Fjeldså, 2004).

Obvyklým místem hnízdění potápek jsou sladké vody, ale za tahu se zdržují i na moři, kdy právě na vodě tráví tyto ptáci většinu života. Stavějí plovoucí hnízda většinou z již zetlelých vodních rostlin, které nakupí na vodní hladině a ukotví mezi porosty nad vodu vystupujících bylin. Tlející vodní rostliny pravděpodobně napomáhají k udržování teploty vajec v nepřítomnosti rodičů. Vodu opouštějí pouze za letu, který je přímočarý, rychlý a hlava i krk jsou při něm nataženy dopředu. Jelikož jsou jejich křídla krátká a kostra málo pneumatizovaná, zvedají se potápky z hladiny obtížně (Hudec *et al.*, 1994).

Všechny druhy potápek mají velice výrazné a silné projevy toku, které jsou charakteristicky vyvinuté zejména u potápky roháče. Potápky žijí v monogamii a páří se na hnízdech (Fjeldså, 2004). Nejčastěji samice kladou 3–7 malých vajec bílé barvy, která postupně hnědnou vlivem tlejícího hnízdního materiálu. Sezení začíná po snesení prvního vejce a obvykle trvá u menších druhů 20 dní, u větších až o týden déle. Mláďata umějí plavat již po vylíhnutí, a pokud jim hrozí nebezpečí, jsou schopna se i potopit. Jelikož ale nesnesou delší pobyt ve vodě kvůli nedokonalé termoregulaci, jsou rodiči vozena na zádech a zahřívána. Mláďata potápky dostávají nejprve potravu přímo do zobáku, později je jim pouze lovena, označujeme je tedy jako polokrmivá (Hudec *et*

al., 1972). Od dospělých potápek se výrazně liší zbarvením, jsou totiž porostlá krátkým prachovým peřím s pestrými červenými znaménky na hlavě a tmavými podélnými pruhy na bílém podkladu (Šťastný *et al.*, 2006).

Větší druhy potápek se živí většinou rybami, pro menší druhy jsou potravou zejména drobní měkkýši a vodní hmyz, přičemž u všech druhů potápek byla zjištěna i příměs rostlinné potravy (Fjeldsá *et al.*, 1994). Aby nedošlo k poškození stěn žaludku rybími kostmi, polykají potápky své vlastní peří vyškubané z břišní strany, které v pylorickém žaludku vytvoří hmotu obalující všechny nestrávené zbytky. Peří i zbytky potravy jsou poté vyvrhovány (Hudec *et al.*, 1994).

Potápky jsou rozšířeny téměř po celém světě, kdy nejvíce druhů žije na území Jižní a Střední Ameriky, dále obývají Afriku, Eurasii, Madagaskar a Austrálii (del Hoyo *et al.*, 1992). Nejpozoruhodnější jsou dva endemické druhy, tj. žijící na jediném místě na světě, kam se řadí potápka Taczanovského (*Podiceps taczanowskii*) vyskytující se v Peru a potápka krátkokřídlá (*Rollandia micropterum*) žijící v Andách, která má zcela zakrnělá křídla, tudíž není schopna létat (Hanzák *et al.*, 1963).

Podle Howard *et al.* (1991) zahrnuje čeleď potápkovití (Podicipedidae), která je jedinou čeledí řádu potápky, 21 druhů rozdělených do pěti rodů. Do rodu *Tachybaptus* patří potápka australská (*T. novaehollandiae*), nejmenší (*T. dominicus*), malá (*T. ruficollis*), madagaskarská (*T. pelzelni*) a skořicovohrdlá (*T. rufolavatus*), do rodu *Podiceps* spadá osm druhů: Potápka roháč (*P. cristatus*), argentinská (*P. gallardoi*), žltorohá (*P. auritus*), velká (*P. major*), stříbřitá (*P. occipitalis*), Taczanovského (*P. taczanowskii*), černokrká (*P. nigricollis*) a rudokrká (*P. griseogena*). Rod *Poliiocephalus* zahrnuje potápku novozélandskou (*P. rufopectus*) a šedohlavou (*P. poliocephalus*). Potápka západní (*A. occidentalis*) a Clarkova (*A. clarkii*) patří do rodu *Aechmophorus* a potápka šedá (*P. podiceps*) a obrovská (*P. gigas*) do rodu *Podilymbus*. Poslední rod *Rollandia* zahrnuje potápku krátkokřídlou (*R. micropterum*) a Rollandovu (*R. rolland*).

Na našem území žije celkem pět druhů potápek, z nichž nejmenší je potápka malá. Její velikost lze přirovnat k velikosti zaťaté pěsti a většinou hnízdí v rákosí na menších rybnících, mrtvých ramenech řek nebo na zarostlých tůňkách. O něco větším druhem je potápka černokrká, která má ve svatebním šatu typický chomáč žlutých pírek za okem a na našem území se vyskytuje poměrně hojně v rybničnatých oblastech. Potápka rudokrká se vyznačuje rezavě červeným krkem a žlutým kořenem zobáku.

Hnízdí většinou na zarostlých rybnících či jezerech v nižších polohách, avšak na našem území se vyskytuje poměrně vzácně. Potápka žltorohá hnízdí v České republice vzácně, ale každoročně většinou na hustě zarostlých a mělkých jezerech. Ve svatebním šatu má výrazné žluté opeření za okem a červenou přední stranu krku a hrudi, jinak se vzhledem podobá potápce černokrké. Posledním druhem potápky žijící na našem území je potápka roháč, které je věnována následující kapitola (Svensson *et al.*, 2016).

3.1.1. Potápka roháč

Systematické zařazení potápky roháče podle del Hoyo *et al.* (1992) a Gaisler *et Zima* (2007) je následující:

<u>Říše:</u>	živočichové (Animalia)
<u>Kmen:</u>	strunatci (Chordata)
<u>Podkmen:</u>	obratlovci (Vertebrata)
<u>Třída:</u>	ptáci (Aves)
<u>Podtřída:</u>	letci (Neognathae)
<u>Řád:</u>	potápky (Podicipediformes)
<u>Čeleď:</u>	potápkovití (Podicipedidae)
<u>Rod:</u>	potápka (<i>Podiceps</i>)
<u>Druh:</u>	potápka roháč (<i>Podiceps cristatus</i>)

Potápka roháč je největším zástupcem potápek na našem území a již na první pohled lze dospělého jedince rozeznat od kachny nebo lysky díky dlouhému, štíhlému, bíle zbarvenému krku, tmavě lemovanému límci a hustým pírům po stranách hlavy. Samci i samice mají na hlavě pírka podobná růžkům, od kterých je odvozen název druhu (Hanzák *et* Hudec, 1963). Přední strana krku i spodní část těla jsou po celý rok bílé, zatímco hřbetní část má černohnědou barvu (Šťastný *et al.*, 2006). Mladí ptáci nemají límeček, jsou světlejší s tmavým temenem hlavy a podélnými tmavými proužky na bílém podkladu (viz Obr. 1).

Obr. 1: Rodiče potápky roháče s mlád'aty (Zdroj: <https://naturfotografenforum.de/>). Navštíveno: 13. 11. 2016.



Potápka roháč žije nejen na našem území, ale najdeme ji téměř v celé Evropě, v Asii, Africe, Austrálii, ale i v Tasmánii a na Novém Zélandě (Hudec *et al.*, 1994; Fjeldsá, 2004). Ve všech případech upřednostňuje sladké stojaté vody s rybami a vodními rostlinami, vzácně však může hnízdit i na slaných a brakických vodách, v České republice jsou pro ni ideální podmínky na většině rybníků s výskytem rákosí, kde staví svá hnízda, avšak hrozbu pro výskyt potápky představuje zejména znečištění, odvodňování a vysušování vodních ploch, a tím ztráta jejího přirozeného biotopu. Hnízdo stavějí samec i samice z rostlin nalezených na dně rybníka a může dosahovat různých rozměrů (Hudec *et al.*, 1972).

Tito ptáci většinou hnízdí v párech, vzácněji potom v koloniích. Ihned po přiletu na vodní plochu, tedy po jejím rozmrznutí, začíná tok, který se skládá z několika fází a zahrnuje například potřepávání hlavou obou dospělých jedinců, zajíždění špičky zobáku mezi peří na lopatkách, excitační fáze je pak typická přiblížením se hrudí k sobě a vztyčením se na vodě, tedy již při hledání místa hnízdění bývají spáření (del Hoyo *et al.*, 1992).

Po vybudování hnízda začne samice snášet vejce, která jsou většinou tři až čtyři, mají bílou až světle namodralou barvu a v sezení na nich se střídají oba rodiče. Mlád'ata

se z vajec většinou klubou ve dvoudenních intervalech, jelikož potápky roháči začínají sedět na vejcích již po snesení toho prvního (Hudec *et al.*, 1972). Mláďata jsou již několik hodin po vylíhnutí schopna se potápět, avšak tráví nejvíce času na hřbetech rodičů, kde se zahřívají.

Potápka roháč je vodním ptákem v pravém slova smyslu, na hladině se pohybuje rychlostí až 7 km za hodinu a má hluboký ponor. Pokud jí hrozí nebezpečí, je schopna pod vodou vydržet necelou minutu, přičemž urazí asi 50 m (Hanzák *et Hudec*, 1963). Hlavními složkami potravy jsou ryby, žáby, užovky, hmyz, ale také měkkýši a jiní bezobratlí (Hudec *et al.*, 1972).

Jedná se o ptáky tažné, kteří se před odletem shlukují v hejna a během října odlétají většinou do Středomoří mezi Itálií a Skadarským jezerem a zpět na hnízdiště přilétají v březnu (Šťastný *et al.*, 2006).

3.2. Fylogenetické zařazení potápkovitých v systému ptáků

Přestože je fylogenetický systém ptáků častým předmětem studií, výsledky se stále rozcházejí. Zjištění jejich evolučních vztahů je velmi obtížné, například z důvodu existence výrazně se odlišujících druhů ptáků v rámci jednotlivých skupin (např. sovy, holubi a papoušci) (Hackett *et al.*, 2008).

Pouze dva nody u základny ptačího stromu jsou podpořeny morfologicko-fylogenetickými i molekulárně genetickými daty, z nichž první rozděluje Paleognathae (tinamy a běžce) a Neognathae (ostatní ptáky) a druhý dělí Neognathae na Galloanserae (vrubozobí a hrabaví) a Neoaves (zbylí Neognathae). Molekulárně genetické metody studující fylogenetické vztahy zahrnují DNA-DNA hybridizaci, analýzu ribozomální RNA, mitochondriálních genomů a exonových a intronových sekvencí (Hackett *et al.*, 2008).

Potápky a potáplice byly do první poloviny 20. století zařazovány do společného řádu z důvodu jejich společných morfologických znaků. Teprve v roce 1925 byly zjištěny první odlišnosti v rámci těchto dvou skupin a následně byl vyvozen závěr, že podobnost je výsledkem konvergentní evoluce (Fjeldså, 2004).

Fylogenetické studie systému vodních ptáků navazují na fakt, že potápkovití představují větev poměrně vzdálenou od potáplíc, což bylo výsledkem studie vědců Sibley *et Ahlquist* (1990), kteří na základě výsledků DNA-DNA hybridizace přesunuli právě potáplícovité do blízkosti tučňáků a trubkonosých.

Van Tuinen *et al.* (2001) studovali fylogenetické vztahy pomocí analýzy sekvencí jaderných a mitochondriálních genomů od 26 zástupců brodivých a krátkokřídlých a DNA-DNA hybridizace. Výsledkem bylo vyčlenění plameňákovitých (Phoenicopteridae) ze společného kladu s kachnovitými (Anatidae) a zároveň vytvoření společného kladu pro potápkovité (Podicipedidae) a plameňákovité.

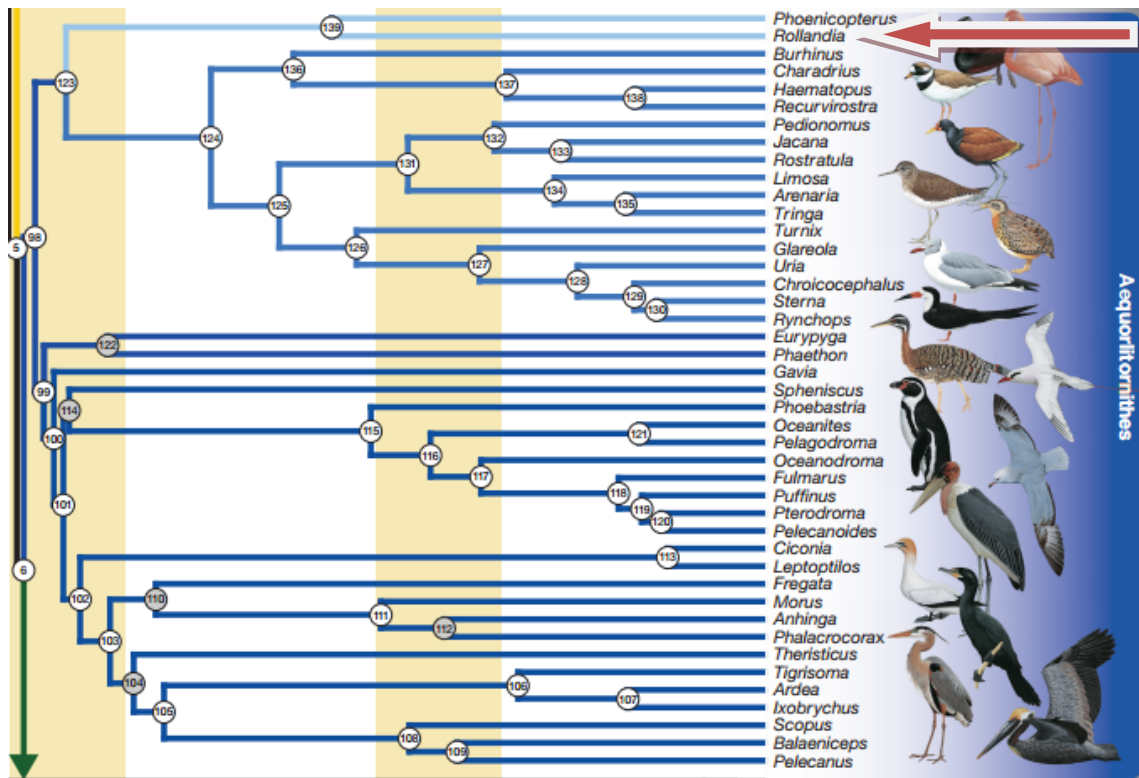
Hypotézu, že potápkovití a plameňákovití tvoří monofyletický taxon, potvrdil také Mayr (2004), který provedl kladistickou analýzu celkem 70 morfologických znaků hodnocených u 17 různých ptačích taxonů.

Sesterské postavení těchto dvou čeledí potvrdili také Ericson *et al.* (2006), kteří použitím genomické DNA získané z krve nebo vzorků tkáně 87 druhů kladu Neoaves reprezentujících 75 čeledí a následnou analýzou celkem pěti genových oblastí (protoonkogen *c-myc*, gen RAG-1, β -fibrinogen, myoglobin a ornitindekarboxyláza).

Hackett *et al.* (2008) využili pro fylogenetickou analýzu DNA sekvenci o velikosti 32 kbp od 169 ptačích druhů z devatenácti nezávislých jaderných lokusů nacházejících se na patnácti různých chromozomech v rámci genomu kura domácího, s introny (74 %), kódujícími exony (23 %) a nepřekládanými oblastmi (UTR) (3 %). Výsledky této studie napomohly k fylogenetickému zařazení některých problematicky zařaditelných skupin ptáků, kromě toho bylo potvrzeno sesterské postavení potápek (Podicipediformes) a plameňáků (Phoenicopteriformes), naopak potápky a potáplíce (Gaviiformes) si jsou v rámci fylogenetického zařazení velmi vzdálené.

Nejnovější studie systému velkých vodních ptáků (Prum *et al.*, 2015) založená na next-generation DNA sekvenování, řadí potápky (společně s plameňáky) do kladu Aequorlornithes, který se dělí na dvě skupiny. Do první z nich patří řád plameňáci a potápky, přičemž dlouhokřídlí jsou jejich sesterskou skupinou a do druhé pak na několik skupin rozdělené a vzájemně promíchané (v tradičním pojetí) řády veslonozí, brodiví, potáplíce, tučňáci, trubkonosí a nově také slunatci, kteří byli dříve řazeni mezi krátkokřídlé (viz Obr. 2).

Obř. 2: Nově uspořádaný fylogenetický klad Aequorlitorinithes (Prum *et al.*, 2015).



Legenda: Červená šipka – řád potápky (rod *Rollandia*)

3.3. Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou krátké tandemově se opakující DNA motivy, přičemž délka motivu se pohybuje mezi 1–6 páry bazí. Nejčastěji se vyskytující v rámci celého prokaryotického i eukaryotického genomu a jeho kódujících i nekódujících oblastí jsou mikrosatelity s délkou repetiční jednotky jeden, dva nebo tři nukleotidy (Ellegren, 2004). Četnost různých motivů mikrosatelitů je závislá především na druhu. U savců jsou to motivy AC, AG, AGC a AAAG, naopak u rostlin se jedná o AT, AAG, AG a AAC (Tóth *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2002). Můžeme tedy pozorovat rozdíly v délce, motivu i frekvenci mikrosatelitů mezi jednotlivými skupinami organismů.

Mikrosatelity dělíme tedy jednak na základě délky jejich repetice, a také podle struktury repetice na dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené. V dokonalém mikrosatelitu není opakující se sekvence nijak přerušena (např. TATATATATATATA), sekvence nedokonalého mikrosatelitu naopak obsahuje bázi, která není součástí základního motivu (např. TATATATACTATATA). V případě přerušovaných mikrosatelitů obsahuje sekvence větší množství bazí neobsažených v základním motivu (např. TATATACCGTGTTATATATA) a složené mikrosatelity

obsahují dvě sousedící odlišné repetitivní sekvence (např. TATATATATAGTGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

Existence mikrosatelitů v eukaryotických genomech je známa od roku 1970 (Bruford *et al.*, 1996) a jejich množství koreluje s velikostí daného genomu (Hancock *et al.*, 1999). Výskyt mikrosatelitů je velice hojný a počet mutací exponenciálně roste s délkou mikrosatelitu (Rose *et Falush*, 1998). Jeden z procesů odpovědných za vyšší výskyt mutací v mikrosatelitech oproti zbytku genomu se nazývá „DNA sklouznutí“, které je způsobeno sklouznutím DNA polymerázy během replikace (Richard *et Sutherland*, 1994). Vyklouznutá struktura poté může být stabilizována do triplexu, kvadruplexu nebo vlásenky. Druhým procesem podílejícím se na vyšší frekvenci mutací je nerovnoměrná rekombinace (Jakupciak *et Wells*, 2000). Tyto dva děje probíhající v tandemově se opakujících sekvencích vedou ke ztrátě nebo naopak přidání jednotky v rámci repetyce (Schlötterer *et al.*, 2000; Ellegren *et al.*, 2004).

Díky výše uvedeným vlastnostem jsou mikrosatelity využívány při konstrukcích genetických map (Knapik *et al.*, 1998; Cregan *et al.*, 1999), pro genotypizaci a analýzu otcovství (Wright *et Bentzen*, 1994; Schlötterer *et al.*, 2000), dále je využívána souvislost mezi nestabilitou, počtem jednotek opakování a výskytem lidských genetických onemocnění (Mahadevan *et al.*, 1992; Stallings *et al.*, 1994; O' Donnell *et Warren*, 2002). Přestože byly mikrosatelity původně určeny pro výzkum u lidí, jejich analýza se stala nástrojem také při studiu živočichů (Schlötterer *et al.*, 1991) i rostlin (Dayanandan *et al.*, 1997; Steinkellner *et al.*, 1997; White *et Powell*, 1997; Cipriani *et al.*, 1999; Roa *et al.*, 2000; Collevatti *et al.*, 2001).

Využití mikrosatelitových markerů v různých studiích je však znevýhodněno nutností izolace mikrosatelitů *de novo* u druhů, u kterých studie mikrosatelitů doposud neproběhly. V tomto případě je potřebné sekvence mikrosatelitů najít, osekvenovat, navrhnout k nim příslušné primery, amplifikovat je a otestovat na polymorfismus (Rassmann *et al.*, 1991).

3.3.1. Hledání nových mikrosatelitů a *cross-species* PCR amplifikace

De novo izolace mikrosatelitů

V posledním čtvrtstoletí se mikrosatelity staly jedním z nejčastěji používaných molekulárních markerů s možností aplikace v mnoha různých výzkumných oblastech zejména díky jejich vysokému stupni polymorfismu a relativně snadné detekci. Hlavní nevýhodou mikrosatelitů je však nutnost jejich izolace *de novo* u druhů, u kterých tyto studie probíhají poprvé, tedy nedostatek „univerzálních“ PCR primerů, které by úspěšně amplifikovaly homologní mikrosatelitové produkty napříč různými druhy. Podstatou izolace mikrosatelitů *de novo* je počáteční fragmentace DNA za pomoci restričních enzymů nebo ultrazvuku, pak následuje vložení fragmentů o určité délce do plazmidového vektoru. Vektor je poté vložen do bakteriální buňky, kterou je většinou *Escherichia coli*, která díky svému dělení produkuje rekombinantní klony, jež hybridizují se sondou na nylonové membráně. Fragmenty obsahující dané repetice jsou sekvenovány, k oblastem obklopujícím mikrosatelit z obou stran jsou navrhovány primery a poté je mikrosatelit otestován PCR amplifikací na polymorfismus a charakterizován (Zane *et al.*, 2002).

Izolace mikrosatelitů je poměrně náročná na čas i kroky, které je nutné v postupu provést, kdy obvykle zahrnuje skrínk genomických knihoven vhodnými sondami (Rassmann *et al.*, 1991). Množství pozitivních klonů obsahujících mikrosatelity, které lze získat pomocí tohoto tradičního postupu se pohybuje od 12 % do méně než 0,04 %. Tuto izolační strategii však lze použít u taxonů s vysokou frekvencí mikrosatelitů, jako je tomu u některých ryb nebo jiných obratlovců a v případech potřeby relativně nízkého počtu mikrosatelitů (Bernatchez *et al.*, 2000).

Cross-species PCR amplifikace mikrosatelitů

Přestože mikrosatelitové primery obecně nelze použít univerzálně, určitá úroveň amplifikace mikrosatelitů mezi blízce příbuznými druhy je možná (Moore *et al.*, 1991; Schlötterer *et al.*, 1991). Úspěšnost amplifikace mikrosatelitů napříč druhy je spojena s evoluční rozmanitostí mezi druhy, ze kterých jsou mikrosatelitové markery izolovány (zdrojový druh) a druhy cílovými (Primmer *et al.*, 1996).

Mikrosatelity se obvykle vyskytují v nekódujících regionech, kde je rychlost substituce nukleotidů vyšší než v oblastech kódujících, a tudíž strategie navrhování

„univerzálních“ primerů využívající konzervované sekvence, která byla velice úspěšná pro mitochondriální DNA (Kocher *et al.*, 1989), je u mikrosatelitů poněkud problematičtější. Nicméně přítomnost vysoce konzervovaných obklopujících sekvencí byla prokázána již u některých mikrosatelitových lokusů u kytovců (Schlötterer *et al.*, 1991), želv (Fitzsimmons *et al.*, 1995) a ryb (Rico *et al.*, 1996).

Evoluční vztahy mezi jednotlivými druhy byly pomocí *cross-species* PCR amplifikace rozsáhle studovány u ptáků (Primmer *et al.*, 1996; Hughes *et al.*, 1998; Dallimer *et al.*, 1999; Dawson *et al.*, 2000; Galbusera *et al.*, 2000), přičemž Dawson *et al.* (2010) poprvé použili EST ptačí mikrosatelity a Dawson *et al.* (2013) také konzervované ptačí mikrosatelity. V těchto studiích byl často pozorován negativní vztah mezi úspěšností *cross-species* PCR amplifikace a evoluční vzdáleností zdrojového a cílového druhu (Rubinsztein *et al.*, 1995; Morin *et al.*, 1998). Výsledky studií u ptáků (Primmer *et al.*, 1996) naznačují 50% míru úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace z hlediska získání mikrosatelitového produktu.

Amplifikace mikrosatelitů

Při analýze PCR produktů v elektroforetickém gelu lze narazit na problémy, které komplikují hodnocení výsledku a jsou to zejména nulové alely, *stutter* bandy a alelové homoplazie. Nulové alely se nacházejí u většiny taxonů (Dakin *et al.*, 2004), ale běžné jsou zejména u populací s nízkou efektivní velikostí (Chapuis *et al.*, 2007). Nulové alely jsou způsobeny mutacemi v regionech mikrosatelitových lokusů, kam se váží primery, a tím znemožňují amplifikaci lokusu při PCR reakci (Pemberton *et al.*, 1995) nebo přednostní amplifikaci kratších alel (Chapuis *et al.*, 2007). Přítomnost nulových alel může být detekována jako přebytek homozygotů a způsobuje problémy například při rodičovské analýze (Pemberton *et al.*, 1995; Reece *et al.*, 2004).

Homoplazie pro genetický marker nastane, když dochází ke vzniku alel, které jsou identické svou velikostí (bp), avšak liší se svým původem. Vznik alel identických svou velikostí je způsoben mutacemi a dalšími faktory jako je konvergence, mutační rychlost nebo čas divergence mezi jednotlivými populacemi (Goldstein *et al.*, 2003).

Tzv. *stutter* neboli „stínové“ bandy vznikají v blízkosti hlavního produktu a způsobují problémy, zejména pokud se vyskytují u jedné alely, jejíž produkt se

překrývá právě se stínovým bandem (Walsh *et al.*, 1996). Tyto bandy jsou důsledkem sklouznutí DNA polymerázy při PCR amplifikaci.

3.3.2. Mikrosatelity polymorfni u potápky roháče

V rámci řádu potápky dosud byly *de novo* mikrosatelity popsány pouze od potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*) (Sachs *et Hughes*, 1999) a od potápky západní (*Aechmophorus occidentalis*) (Humple, 2009), nikoli však od potápky roháče. Hoffmannová (2013) v rámci diplomové práce otestovala celkem 410 mikrosatelitů u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče, které by mohly být u tohoto druhu polymorfni a dosud nebyly otestovány.

Od druhů kladu Aequorlitorinithes (Prum *et al.*, 2015) se jednalo celkem o 396 mikrosatelitů, kdy osmnáct z nich bylo nalezených od zástupců řádu potápky (Sachs *et Hughes*, 1999; Humple, 2009), 169 mikrosatelitů od zástupců řádu brodiví (Ciconiiformes) (Van Den Bussche, 1999; McGuire *et Noor*, 2002; Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2004; He *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Sawyer *et Benjamin*, 2006; Chang *et al.*, 2009; Shephard *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2009; Hill *et Green*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Campanini *et al.*, 2012), 152 mikrosatelitů od zástupců řádu veslonozí (Pelecaniformes) (Piertney *et al.*, 1998; Dearborn *et al.*, 2008; Duffie *et al.*, 2008; Hickman *et al.*, 2008; De Ponte Machado *et al.*, 2009; Faircloth *et al.*, 2009; Fike *et al.*, 2009; Barlow *et al.*, 2010; Humeau *et al.*, 2010; Mercer *et al.*, 2010; Morris-Pocock *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2010), 47 mikrosatelitů z řádu plameňáci (Phoenicopteriformes) (Preston, 2005; Kapil *et al.*, 2009; Geraci *et al.*, 2010), sedm mikrosatelitů od zástupců řádu potáplice (Gaviiformes) (McMillan *et al.*, 2004), dva mikrosatelity od alkounka drobného (*Aethia pygmaea*) z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) (Dawson *et al.*, 2005) a jeden mikrosatelit od tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*) z řádu tučňáci (Sphenisciformes) (Roeder *et al.*, 2001).

Dále testovala na polymorfismus třináct mikrosatelitů od zástupců řádu vrubozobí (Anseriformes) (Maak *et al.*, 2000; Maak *et al.*, 2003; Paulus *et Tiedmann*, 2003; Stai *et Hughes*, 2003; Guay *et Mulder*, 2005) a jeden mikrosatelit od pratura indického, zebu (*Bos indicus*) z řádu sudokopytníci (Artiodactyla) (Lei *et al.*, 2005).

Hoffmannová (2013) našla u potápky roháče celkem 42 polymorfni lokusů. Čtrnáct polymorfni mikrosatelitů původně pocházelo od zástupců řádu potápky, konkrétně devět mikrosatelitů bylo původně navrženo pro potápku západní

(*Aechmophorus occidentalis*) a pět lokusů bylo původně navrženo pro potápku rudokrku (*Podiceps grisegena*). Tři mikrosatelity pocházely od zástupců řádu brodiví, kdy dva z nich (Aaju5 a AajuSEX) byly izolovány od kolpíka růžového (*Ajaia ajaja*) a tři byly původně nalezeny u ibise rudého (*Eudocimus ruber*). V rámci testovaných mikrosatelitů od zástupců řádu veslonozí jich vykazovalo polymorfismus čtrnáct: Mikrosatelit Ae42 byl od volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*), mikrosatelit Ah 526 byl od volavky velké (*Ardea herodias*), mikrosatelit Bi08 byl od volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*), další dva mikrosatelity pocházely od tereje modronohého (*Sula nebouxii*), mikrosatelit COR 05 byl od kormorána ušatého (*Phalacrocorax auritus*), mikrosatelit Fmin13 pocházel od fregatky obecné (*Fregata minor*), mikrosatelitový lokus NnNF5 pocházel od ibise čínského (*Nipponia nippon*), jeden mikrosatelit (PcD 2) byl od kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), další dva mikrosatelity (PeEr 03 a PeEr 04) byly od pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*) a tři mikrosatelity od zástupců čeledi terejovití, konkrétně od tereje guánového (*Sula variegata*) a tereje červenonohého (*Sula sula*). Sedm polymorfních mikrosatelitů pocházelo od plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) z řádu plameňáci, jeden z polymorfních mikrosatelitů (Apy06) pocházel od alkounka drobného (*Aethia pygmaea*) z řádu dlouhokřídli a mikrosatelit APH07 byl od kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) z řádu vubozobí.

Nalezené polymorfní mikrosatelity měly u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče od dvou do jedenácti alel, kdy největší počet alel byl detekován u mikrosatelitu B8 od potápky západní a mikrosatelity E202 od potápky západní a PgAAT8 od potápky rudokrky měly po deseti alelách.

Jelikož byla potápka roháč v rámci nejnovějších studií zařazena do kladu Aequorlitorornithes (Prum *et al.*, 2015), otestovaly jsme já (Janušová, 2015) na *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelity původně navržené pro zástupce řádu trubkonosí a Filipová (2016) mikrosatelity od tučňáků, konzervované ptačí mikrosatelity a EST ptačí mikrosatelity u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče v rámci našich bakalářských prací.

Já jsem v rámci své bakalářské práce (Janušová, 2015) testovala na polymorfismus u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče celkem 215 mikrosatelitů, z nichž dvacet vykazovalo polymorfismus, konkrétně se jednalo o 209 mikrosatelitů izolovaných od zástupců řádu trubkonosí a zbylých šest mikrosatelitů pocházelo od čtyř

druhů ze dvou jiných ptačích řádů, konkrétně z řádu dlouhokřídlí a pěvci, jelikož je někteří autoři publikací použili ke svému studiu u některých druhů trubkonosých (Friesen *et al.*, 2006; Lawrence, 2008; Brown *et al.*, 2009; Welch *et al.*, 2011). Z těchto mikrosatelitů nevykazoval polymorfismus u potápky roháče ani jeden.

V rámci čeledi albatrosovití jsem otestovala celkem 55 mikrosatelitů, kdy 21 z nich bylo navržených pro albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*) (Burg, 1999; Dubois *et al.*, 2005), jedenáct mikrosatelitů nalezených u albatrosa šedohlavého (*D. chrysostoma*) (Burg, 1999), čtyři mikrosatelity popsané u albatrosa šedohlavého a zároveň u albatrosa stěhovavého (Burg, 1999), dále po jednom mikrosatelitu, který byl polymorfní u albatrosa šedohlavého a zároveň u albatrosa černobrvého (*D. melanophris*) (Burg *et* Croxall, 2001) a u albatrosa stěhovavého a jižního (*D. antipodensis*) (Burg *et* Croxall, 2004), pět mikrosatelitů izolovaných u albatrosa černonohého (*Phoebastria nigripes*), čtyři mikrosatelity od albatrosa laysanského (*P. immutabilis*) a šest mikrosatelitů od albatrosa bělohřbetého (*P. albatrus*) (Hernandez *et al.*, 2014), přičemž všechny výše uvedené druhy patří do čeledi albatrosovití.

Dále jsem na polymorfismus testovala mikrosatelity od druhů z čeledi buňňákovití, kterých bylo celkem 100 – sedm mikrosatelitů od buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*) (Techow *et* O’Ryan, 2004), jedenáct mikrosatelitů nalezených u buňňáka šedého (*Calonectris diomedea*) (Bried *et al.*, 2008), dva mikrosatelity, které izolovala Lawrence (2008) u buňňáka taiko (*Pterodroma magentae*), šest mikrosatelitů od buňňáka trinidadského (*P. arminjoniana*) (Brown *et* Jordan, 2009), deset mikrosatelitů od buňňáka havajského (*P. sandwichensis*) (Welch *et* Fleischer, 2011), deset mikrosatelitů charakterizovaných u buňňáka baleárského (*Puffinus mauretanicus*) (Gonzalez *et al.*, 2009), jedenáct mikrosatelitů, které našli Hardesty *et al.* (2012) u buňňáka světlenohého (*P. carneipes*), jedenáct mikrosatelitů od buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) (Andris *et al.*, 2010) a 32 mikrosatelitů od buňňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*) (Quilfeldt *et al.*, 2012; Moddley *et al.*, 2015).

Mezi testované patřilo i 54 mikrosatelitů od zástupců čeledi buňňáčkovití, konkrétně deset mikrosatelitů od buňňáčka dlouhokřídlého (*Oceanodroma leucorhoa*), madeirského (*O. castro*) a Monteirova (*O. monteiroi*) (Sun *et al.*, 2009), 26 mikrosatelitů izolovaných u buňňáčka dlouhokřídlého (Bicknell *et al.*, 2011) a osmnáct mikrosatelitů od buňňáčka Monteirova (Bried *et al.*, 2012) z řádu buňňáčkovití.

Jelikož někteří autoři publikací úspěšně testovali na *cross-species* PCR amplifikaci u některých druhů trubkonosých šest mikrosatelitů od čtyř druhů ze dvou

jiných ptačích řádů, zahrnula jsem je do svého testování také. Jednalo se o tři mikrosatelity od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) (Lawrence, 2008 podle Given *et al.*, 2002), po jednom mikrosatelitu od alkouna obecného (*Cephus guilemots*) (Friesen *et al.*, 2006) a od kulíka mořského (*Charadrius alexandrius*) (Brown *et al.*, 2009 podle Küpper *et al.*, 2007). Všechny výše uvedené druhy řadíme do řádu dlouhokřídlí a dále byl předmětem testování mikrosatelit od lesňáčka žlutohého (*Dendroica petechia*) (Welch *et al.*, 2011 podle Dawson *et al.*, 1997) z řádu pěvci.

Výsledky testování ukázaly polymorfismus u dvaceti mikrosatelitů, přičemž pět z nich pocházelo od buňáka světlenohého, po dvou od buňáka útlozobého, Bulwerova, šedého a albatrosa stěhovavého a po jednom mikrosatelitu od buňáka trinidského, taiko, albatrosa stěhovavého, bělohřbetého, buňáčka madeirského, Monteirova a dlouhokřídlého. Polymorfní lokusy měly u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče od dvou do osmi alel, kdy největší počet alel vykazoval mikrosatelit O110-39 izolovaný od buňáčka dlouhokřídlého.

Filipová (2016) ve své bakalářské práci uvádí výsledky testování celkem 171 párů primerů u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče, navržených pro zástupce řádu tučňáci, dále konzervované ptačí mikrosatelity (CAM) a EST ptačí mikrosatelity.

V rámci řádu tučňáci testovala celkem 113 mikrosatelitů, kdy 25 z nich pocházelo od tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*) (Ahmed *et al.*, 2009), 28 mikrosatelitů izolovaných od tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*) (Billing *et al.*, 2007; Grosser *et al.*, 2014), dvanáct mikrosatelitů, které našli Boessenkool *et al.* (2008) u tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*), šest mikrosatelitů charakterizovaných u tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*) (Roeder *et al.*, 2001), šestnáct mikrosatelitů od tučňáka uzdičkového (*P. antarctica*) (Kang *et al.*, 2015), devět mikrosatelitů objevených u tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*) (Akst *et al.*, 2002; Labuschagne *et al.*, 2013), třináct mikrosatelitů od tučňáka Humboldtova (*S. humboldti*) (Akst *et al.*, 2002; Schlosser *et al.*, 2002; Schlosser *et al.*, 2008), tři mikrosatelity od tučňáka galapážského (*S. mendiculus*) (Akst *et al.*, 2002) a jeden mikrosatelit nalezený u tučňáka magellanského (*S. magellanicus*) (Akst *et al.*, 2002).

Dále Filipová (2016) na polymorfismus u potápky roháče otestovala 34 ptačích EST mikrosatelitů (Dawson *et al.*, 2010) a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů (Dawson *et al.*, 2013).

Celkem Filipová (2016) našla devatenáct polymorfních lokusů se dvěma až osmi alelami, z nichž dva pocházely od tučňáka žltorohého, další čtyři od tučňáka nejmenšího, pět konzervovaných ptačích mikrosatelitů a sedm EST ptačích mikrosatelitů. Největší počet alel, tedy osm, byl nalezen u mikrosatelitu TG04-012, který patří do skupiny ptačích EST mikrosatelitů.

3.3.3. Další potencionálně polymorfní mikrosatelity u potápky roháče

Vzhledem k již uvedenému fylogenetickému uspořádání systému vodních ptáků, zmiňuji také 30 mikrosatelitů dosud u potápky roháče netestovaných, které by mohly být u tohoto druhu polymorfní, a proto by bylo vhodné je otestovat.

Konkrétně se jedná o 28 mikrosatelitů izolovaných od zástupců kladu Aequorlornithes, tedy čtrnáct mikrosatelitů, které izoloval Bauer (2007) v rámci své diplomové práce u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), šest mikrosatelitů od plameňáka nejmenšího (*P. minor*) (Zaccara *et al.*, 2011), kdy oba druhy patří do řádu plameňáci, dále pět mikrosatelitů charakterizovaných u marabu afrického (*Leptoptilus crumeniferus*) (Ferrie *et al.*, 2013) a tři mikrosatelity od volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) (Dai *et al.*, 2015), přičemž oba tyto druhy řadíme do řádu brodiví a dále dva EST ptačí mikrosatelity.

Co se týče EST ptačích mikrosatelitů (TG09-014 a TG01-086) (Dawson *et al.*, 2010), Filipová (2016) je v rámci své bakalářské práce netestovala, jelikož originální článek u obou z nich uvádí, že jejich PCR amplifikace u 17 druhů pěvců a dále u kulíka mořského, kolibříka rezavosklého, sovy pálené, agapornise různohrdlého a kura domácího nepřinesla žádný produkt. Spurgin *et al.* (2014) však testoval mikrosalit TG09-014 na PCR amplifikaci u lindušky kanárské a měl u 371 jedinců tohoto druhu 9 alel.

4. Materiál a metody

4.1. Biologický materiál

Svalstvo od třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) bylo pro účely mé diplomové práce poskytnuto Ornitologickou stanicí v Přerově (ORNIS) od ptáků pocházejících z rybníků střední Moravy. Z tohoto biologického materiálu byla poté izolována genomická DNA použitím fenol-chloroformové extrakce, kterou provedl můj školitel a následně rozpustil DNA v TE pufru. Pro následující zpracování byla genomická DNA naředěna na koncentraci 10–30 µg/ml.

4.2. PCR amplifikace

Pro studium polymorfních mikrosatelitů u potápky roháče jsem použila metodu PCR amplifikace, jíž jsem amplifikovala vzorky DNA šesti nepříbuzných jedinců a zjišťovala jsem polymorfismus u dosud netestovaných mikrosatelitů (viz kapitola 4.2.1.). U mikrosatelitů z této skupiny, které vykazovaly polymorfismus spolu s polymorfními mikrosatelity nalezenými v rámci bakalářských prací (Janušová, 2015; Filipová, 2016), jsem provedla genotypizaci na třinácti nepříbuzných jedincích potápky roháče.

Reakční směs měla celkový objem 10 µl, kdy 1 µl tvořila genomická DNA a zbylých 9 µl tvořila PCR reakční směs, jejíž složení je uvedeno v Tab. 1., celkem se tedy jednalo o šest mikrozkušavek o objemu 0,2 ml.

Prvním krokem byla příprava reakční směsi do 1,5ml mikrozkušavky, poté jsem napipetované složky zvortexovala, zcentrifugovala a rozpipetovala do třinácti mikrozkušavek o objemu 0,2 ml, kde jsem již měla nepipetováno po 1 µl genomické DNA třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče.

Při prvním testování daných párů primerů byly v PCR reakční směsi obsaženy 4 µl roztoku MgCl₂ (c=25 mmol/l) (viz Tab. 1), z čehož vyplývá, že koncentrace hořečnatých iontů ve výsledné PCR reakční směsi byla 3 mmol/l, pokud se však po provedení elektroforetické separace a následné vizualizaci mikrosatelitových produktů vyskytovalo více přídatných bandů, pipetovala jsem do PCR reakční směsi poloviční objem roztoku MgCl₂, tedy 4 µl a o 4 µl jsem zvýšila pipetovaný objem vody, aby nedošlo ke změně celkového objemu směsi a tedy aby se nezměnila koncentrace jejich

dalších složek. V takovém případě činila pak koncentrace hořečnatých iontů ve výsledné PCR reakční směsi 1,5 mmol/l.

Tab. 1: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci (pro 6 a 13 vzorků).

Složka	Pipetovaný objem [μl] pro 6 vzorků	Pipetovaný objem [μl] pro 13 vzorků v případě	
		poloviční koncentrace Mg ²⁺	dvoutřetinové koncentrace Mg ²⁺
Deionizovaná voda	44,4	96,8	94,0
Reaction Buffer A 10x	6,7	13,4	13,4
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	8,0	8,0 *	10,8 **
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7	1,4	1,4
Primer R (10 μmol/l)	3,3	6,6	6,6
Primer F (10 μmol/l)	3,3	6,6	6,6
aTaq DNA polymeráza (5U/μl)	1,0	2,0	2,0

Legenda: * – poloviční objem a tedy i koncentrace hořečnatých iontů v PCR reakční směsi; ** – dvoutřetinový objem a tedy i koncentrace hořečnatých iontů v PCR reakční směsi.

PCR amplifikace byla prováděna na DNA šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Jednotlivé PCR reakce se skládaly z 9 μl PCR reakční směsi a 1 μl roztoku DNA. Poté jsem mikrozkušavky s reagensii vložila do termocykleru, ve kterém proběhla PCR reakce (viz Tab. 2):

Tab. 2: Podmínky a průběh PCR reakce.

Reakční kroky	Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas
Počáteční denaturace DNA	1	94	5 min
Denaturace DNA	35	94	30 s
Annealing (nasedání primerů)		50 (viz text)	30 s
Elongace (syntéza DNA řetězce)		72	30 s
Závěrečné prodloužení	1	72	7 min

PCR amplifikaci DNA potápky roháče s každým ze třiceti párů primerů jsem provedla při teplotě *annealingu* 50 °C a v případě, že byl mikrosatelitový produkt nehodnotitelný, jsem v další PCR reakci tuto teplotu snížila nebo zvýšila tak, aby byl výsledkem co nejlépe hodnotitelný produkt pro stanovení polymorfismu.

4.2.1. Testování a charakterizace dosud netestovaných mikrosatelitů

Na polymorfismus u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče použitím *cross-species* PCR amplifikace jsem otestovala třicet párů primerů pro mikrosatelitové lokusy původně polymorfni u plameňáka karibského a plameňáka nejmenšího z řádu plameňáci (viz Tab. 3), marabu afrického a volavky žlutozobé z řádu brodiví (viz Tab. 4) a dva EST ptačí mikrosatelity (TG01-086 a TG09-014) (Dawson *et al.*, 2010).

Od plameňáka karibského a plameňáka nejmenšího jsem na polymorfismus otestovala dvacet mikrosatelitů, které jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Mikrosatelity od plameňáka karibského a plameňáka nejmenšího testované na polymorfismus u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Ve sloupcích je uveden zdrojový druh, název mikrosatelitu a literární zdroj.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>)	PhoeniE5, PhoeniE21, PhoeniE37, PhoeniE45, PhoeniE60, PhoeniE61, PhoeniE66, PhoeniE67, PhoeniE69, PhoeniE81, PhoeniE91, PhoeniE98, PhoeniE104, PhoeniE108	Bauer, 2007
Plameňák nejmenší (<i>P. minor</i>)	Pmin1, Pmin2, Pmin3, Pmin4, Pmin5, Pmin6	Zaccara <i>et al.</i> , 2011

Tab. 4: Mikrosatelity od marabu afrického a volavky žlutozobé testované na polymorfismus u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Ve sloupcích je uveden zdrojový druh, název mikrosatelitu a literární zdroj.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
Marabu africký (<i>Leptoptilus crumeniferus</i>)	Lcru 101, Lcru 105, Lcru 107, Lcru 108, Lcru 109	Ferrie <i>et al.</i> , 2013
Volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)	Ae 50, Ae 51, Ae 52	Dai <i>et al.</i> , 2015

4.2.2. PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitů

DNA třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče jsem pomocí PCR amplifikovala s primery pro mikrosatelity izolované od zástupců řádu tučňáci a trubkonosí, které byly nalezeny jako polymorfni v rámci bakalářských prací Janušová (2015) a Filipová (2016).

Konkrétně se jednalo o dvacet mikrosatelitů od zástupců řádu trubkonosí, 6 mikrosatelitů od zástupců řádu tučňáci, pět konzervovaných ptačích mikrosatelitů a osm EST ptačích mikrosatelitů.

Co se týče mikrosatelitů od zástupců řádu trubkonosí, v rámci mé bakalářské práce (Janušová, 2015) jsem našla třináct polymorfních mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče pocházejících od zástupců čeledi buňňákovití (viz Tab. 5), čtyři mikrosatelity od zástupců čeledi albatrosovití (viz Tab. 6) a tři mikrosatelity izolované od zástupců čeledi buňňáčkovití (viz Tab. 7) a všechny tyto mikrosatelity jsem v této diplomové práci amplifikovala u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče.

Tab. 5: Mikrosatelitové lokusy popsané jako polymorfní v bakalářské práci (Janušová, 2015) pocházející od druhů z čeledi buňňákovití testované u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu, počet alel a teplota *annealingu* (T_a) optimalizované pro PCR u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Počet alel	T_a [°C]	Literární zdroj
Buňňák světlonohý (<i>Puffinus carneipes</i>)	Pc A107	2	51	Hardesty <i>et al.</i> , 2012
	Pc B109 *	5	53	
	Pc D3	3	55	
	Pc D103	2	64	
	Pc B115	2	57	
Buňňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	Patbel2	5	65	Moodley <i>et al.</i> , 2015
	Pacbel_17986	2	68	
Buňňák Bulwerův (<i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb11	3	67	Andris <i>et al.</i> , 2010
	Bb21	5	63	
Buňňák taiko (<i>Pterodroma magentae</i>)	Tch6	2	58	Lawrence, 2008
Buňňák trinidadský (<i>P. arminjoniana</i>)	Parm03	3	54	Brow <i>et Jordan</i> , 2009
Buňňák šedý (<i>Calonectris diomedea</i>)	Cd7	2	52	Bried <i>et al.</i> , 2008
	Cd9	6	52	

Legenda: * – poloviční objem a tedy i koncentrace hořčičných iontů v PCR mixu (1,5 mmol/l) ve srovnání se standardním PCR mixem (3 mmol/l).

Tab. 6: Mikrosatelitové lokusy popsané jako polymorfní v bakalářské práci (Janušová, 2015) pocházející od druhů z čeledi albatrosovití testované u třinácti jedinců potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu, počet alel a teplota *annealingu* (T_a) optimalizované pro PCR u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Počet alel	T_a [°C]	Literární zdroj
Albatros šedohlavý (<i>Diomedea chrysostoma</i>)	Dc27	2	51	Burg, 1999
	Dc5	4	58	
Albatros stěhovavý (<i>D. exulans</i>)	De7	2	58	Dubois <i>et al.</i> , 2005
Albatros bělohřbetý (<i>Phoebastria albatrus</i>)	STAL8	2	59	Hernandez <i>et al.</i> , 2014

Tab. 7: Mikrosatelitové lokusy popsané jako polymorfní v bakalářské práci (Janušová, 2015) pocházející od druhů z čeledi buňňáčkovití testované u třinácti jedinců potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu, počet alel a teplota *annealingu* (T_a) optimalizované pro PCR u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Počet alel	T_a [°C]	Literární zdroj
Buňňáček madeirský (<i>Oceanodroma castro</i>)	Oc49	3	53	Sun <i>et al.</i> , 2008
Buňňáček dlouhokřídý (<i>O. leucorhoa</i>)	O110-39	8	60	
Buňňáček Monteirův (<i>O. monteiroi</i>)	Omn8 *	6	47	Bried <i>et al.</i> , 2012

Legenda: * – poloviční objem a tedy i koncentrace hořčnatých iontů v PCR mixu (1,5 mmol/l) ve srovnání se standardním PCR mixem (3 mmol/l).

V rámci bakalářské práce našla Filipová (2016) u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče šest polymorfních mikrosatelitů původně navržených pro zástupce řádu tučňáci (viz Tab. 8), dalších osm EST ptačích mikrosatelitů (viz Tab. 9) a pět konzervovaných ptačích mikrosatelitů (viz Tab. 10).

Tab. 8: Mikrosatelitové lokusy popsané jako polymorfní v bakalářské práci (Filipová, 2016) od druhů z řádu tučňáci testované u třinácti jedinců potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu, počet alel a teplota *annealingu* (T_a) optimalizované pro PCR u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Počet alel	T_a [°C]	Literární zdroj
Tučňák žlutorohý (<i>Eudyptes chrysolophus</i>)	Ech005	6	44	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
	Ech009	2	68	
Tučňák nejmenší (<i>Eudyptula minor</i>)	Em1	2	53	Billing <i>et al.</i> , 2007
	Em14	3	65	
	Em21	2	57	
	Emm5	2	53	

Tab. 9: Mikrosatelitové lokusy popsané jako polymorfní v bakalářské práci (Filipová, 2016) ze skupiny EST ptačích mikrosatelitů testované u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu, počet alel a teplota *annealingu* (T_a) optimalizované pro PCR u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Počet alel	T_a [°C]	Literární zdroj
EST ptačí mikrosatelity	TG01-040	2	64	Dawson <i>et al.</i> , 2010
	TG02-120	2	63	
	TG03-002 *	3	54	
	TG03-098	2	54	
	TG04-012	8	50	
	TG04-061 *	5	49	
	TG06-009	2	56	
	TG11-011	2	58	

Legenda: * – poloviční objem a tedy i koncentrace hořčičnatých iontů v PCR mixu (1,5 mmol/l) ve srovnání se standardním PCR mixem (3 mmol/l).

Tab. 10: Mikrosatelitové lokusy popsané jako polymorfní v bakalářské práci (Filipová, 2016) ze skupiny konzervovaných ptačích mikrosatelitů testované u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu, počet alel a teplota *annealingu* (T_a) optimalizované pro PCR u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče.

Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Počet alel	T_a [°C]	Literární zdroj
Konzervované ptačí mikrosatelity	CAM-11	5	59	Dawson <i>et al.</i> , 2013
	CAM-17	2	62	
	CAM-19	4	64	
	CAM-23	6	60	
	CAM-24	4	54	

4.3. Elektroforetická separace PCR produktů

Postup 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, přičemž tato separace probíhala v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek.

Příprava polyakrylamidového gelu

- Menší i větší sklo jsem nejprve řádně omyla vodou, na menší sklo jsem použila také saponát. Následně jsem obě skla opláchla deionizovanou vodou, osušila jsem je, dvakrát ošetřila 96% etanolem a nakonec osušila pomocí papírových ubrousků.
- Na větší sklo jsem nanasla přípravek pro odpuzování vody ze skel automobilů (tekuté stěračce – Rain off) na plochu, která později přišla do styku s gelem. Po rozetření přípravku papírovým ubrouskem a 5 minutách zaschnutí jsem sklo opláchla deionizovanou vodou a opět osušila.
- Na menší sklo jsem nanasla 1 ml molekulárního lepidla opět na plochu, která se později dotýkala gelu, následně jej rozetřela papírovým ubrouskem, nechala 5 minut schnout a čtyřikrát opláchla pomocí 96% etanolu.
- V digestoři jsem si nachystala desku z polystyrenu, kam jsem položila větší sklo ošetřenou plochou směrem nahoru a po jeho stranách jsem položila spacers o tloušťce 0,4 mm. Poté jsem přiložila menší sklo tentokrát ošetřenou plochou směrem dolů a spacers upravila tak, aby lemovaly kraje obou skel a po obou stranách jsem je v tomto místě sepnula klipsy.

- Dále jsem si připravila polyakrylamidový gel, který jsem pomalu nalévala mezi skla, na která jsem při tom jemně poklepávala z důvodu zamezení vzniku vzduchových bublin.
- Na místo, kde jsem nalévala gel mezi obě skla, jsem nakonec vsunula hřebínek a připevnila jej pomocí dalších klipsů. Poté jsem přibližně hodinu čekala, než gel zcela zpolymerizuje.

Elektroforetická separace PCR produktů

- Poté, co gel zpolymerizoval, jsem odstranila všechny klipsy, ze skel jsem odmyla zbytky polyakrylamidového gelu a vložila jej do elektroforetické komůrky.
- Do prostoru, kde se nachází anoda a katoda, jsem nalila 0,5 x TBE pufr, vytáhla jsem hřebínek a mezeru, která tím vznikla mezi skly, jsem vyčistila proudem pufru z injekční stříkačky.
- Katodový a anodový prostor jsem poté uzavřela, ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu jsem připojila obě elektrody a na zdroji nastavila následující hodnoty: konstantní výkon 90 W a hodnoty elektrického proudu (150 mA) a napětí (3000 V). Za těchto podmínek se gel nahříval 30 minut.
- Zatímco se gel nahříval, připravila jsem si vzorky smísením PCR produktu a 5 μ l nanášecího pufru a následně jsem je na dobu tří minut vložila do termocykleru za účelem denaturace při teplotě 94 °C. Po denuraci jsem vzorky přenesla do ledové tříště, aby nedošlo k renaturaci.
- Po nahřátí gelu jsem vypnula zdroj proudu, odpojila jsem katodu a opět za pomoci injekční stříkačky vyčistila prostor mezi skly. Do tohoto prostoru jsem zasunula hřebínek, tak aby zasahoval asi 1 mm do gelu. Poté jsem zdenaturované vzorky o objemu 2 μ l nanasla pomocí osmikanálové pipety mezi zoubky hřebínku.
- Jakmile jsem všechny potřebné vzorky nanasla, zavřela jsem katodový prostor, připojila elektrodu a na zdroji proudu jsem nastavila výkon na hodnotu 70 W. Elektroforetická separace poté probíhala 80–180 minut dle předpokládané délky separovaných PCR produktů.

Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci

- Po elektroforetické separaci jsem vypnula zdroj proudu, následně odpojila obě elektrody, skla s gelem jsem vyndala z elektroforetické komůrky a oddělila je pomocí nože od sebe.
- Menší sklo, na kterém byl gel přilepený, jsem vložila do fotomisky tak, aby gel směřoval nahoru, fotomisku jsem uložila na třepačku do digestoře, sklo s gelem jsem zalila fix/stop roztokem a nechala třepat 20 minut.
- Poté jsem roztok nalila zpět do baňky a sklo s gelem jsem důkladně promyla pomocí deionizované vody, sklo jsem opět vrátila do fotomisky a zalila 1% roztokem kyseliny dusičné po dobu 4 minut.
- Následně jsem opět roztok kyseliny dusičné vylila, opět jsem sklo s gelem několikrát promyla deionizovanou vodou a tentokrát umístila do fotomisky s roztokem 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného na půl hodiny.
- Ke konci této doby jsem si připravila jednu fotomisku s deionizovanou vodou a druhou, do které jsem sklo s gelem po pěti vteřinách oplachování ve vodě přenesla a zalila vývojkou. Poté jsem sklo s gelem nechala ve fotomisce na třepačce tak dlouho, dokud nebyly viditelné hnědočerné proužky obarvených PCR produktů. Tuto vizualizaci jsem zastavila zalitím fix/stop roztokem.
- Gel jsem opláchla v deionizované vodě, usušila jej v sušárně a vyhodnotila za pomoci vedoucího práce na negatoskopu.

4.4. Statistické hodnocení výsledků testování

Ke zpracování výsledných genotypů jsem použila dva populačně-genetické programy (Cervus 3.0.3 a Genepop 4.1), přičemž použitím programu Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007) byly stanoveny hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti u mikrosatelitových lokusů, které byly u potápky roháče polymorfni, dále obsah polymorfni informace, pravděpodobnost, s jakou se mohou vyskytnout nulové alely a zda je lokus v Hardy-Weinbergově rovnováze. Za pomoci webové verze programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008), jsem zjistila, zda jsou polymorfni mikrosatelitové lokusy ve vazbě.

4.5. Seznam použitých chemikálií

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l, 400 μl každého), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Lachner)
- Ethanol – 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachner)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N'-metylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Rain off – tekuté stěračce (Sheran)
- Thiosíran sodný (Lachner)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.6. Seznam použitých roztoků

Zásobní roztok 10x TBE pufr

- 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 55 g kyseliny borité
- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)

- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Zásobní 6% roztok akrylamidu

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

Vývojka

- 800 ml deionizované vody
- 24 g uhličitanu sodného
- vychladit na teplotu nižší než 10 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného

Nanášecí pufovací roztok

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

Molekulární lepidlo

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

Fix/Stop roztok

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

6% polyakrylamidový gel

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

10% roztok peroxodisíranu amonného

- 1 g peroxodisíranu amonného
- rozpustit v 8 ml deionizované vody a po rozpuštění doplnit na 10 ml
- uchovávat v chladničce

1 mol/l roztok hydroxidu sodného

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

1% roztok kyseliny dusičné

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

0,1% roztok dusičnanu stříbrného

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

4.7. 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 FinnpiPETTE – 0,5 až 10 μ l (osmikanálová) a 0,3 μ l až 1 ml (ThermoLabsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 μ l až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)

- Termocyklér GenePro (BIOER Technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5. Výsledky

Praktická část této diplomové práce měla několik cílů, nejprve bylo mým úkolem otestovat na polymorfismus 30 mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče, které by mohly být polymorfní a dosud u tohoto druhu nebyly testovány.

Dále bylo mým úkolem amplifikovat z nich vybrané polymorfní mikrosatelity na DNA třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče a též i primery pro mikrosatelitové lokusy odvozené od zástupců řádu trubkonosí a tučňáci, které byly nalezeny jako polymorfní v rámci bakalářských prací Janušová (2015) a Filipová (2016). U mikrosatelitů, které se potvrdily jako polymorfní, jsem pomocí statistických softwarů Cervus 3.0.3 a Genepop 4.1 zjistila jejich populačně-genetické charakteristiky.

V případě dosud netestovaných 30 mikrosatelitů se jednalo o dva EST ptačí mikrosatelity a mikrosatelity od zástupců kladu Aequorlitorornithes, tedy pět mikrosatelitů od marabu afrického, tři mikrosatelity od volavky žlutozobé, přičemž oba druhy řadíme do řádu brodiví (viz Tab. 4), dále čtrnáct mikrosatelitů od plameňáka karibského a šest mikrosatelitů od plameňáka nejmenšího, kteří patří do řádu plameňáci (viz Tab. 3). Nejprve jsem amplifikovala všech těchto 30 mikrosatelitů při teplotě *annealingu* PCR reakce 50 °C a provedla elektroforetickou separaci, v případě, že PCR neposkytla produkt, amplifikovala jsem mikrosatelity znovu, ale tentokrát při nižší teplotě *annealingu* PCR reakce, kdy nejnižší teplota činila 44 °C. Pokud však byly bandy produktu příliš intenzivní nebo došlo k jejich překryvu, naopak jsem teplotu *annealingu* PCR reakce zvýšila až na 68 °C. U polymorfních mikrosatelitů jsem tedy stanovila optimální teplotu *annealingu* (T_a) PCR reakce, koncentraci hořčičných iontů v PCR reakční směsi a délku elektroforetické separace.

Ze třiceti dosud netestovaných mikrosatelitů jich bylo u potápky roháče polymorfních sedm, jednalo se o čtyři mikrosatelity od plameňáka karibského (PhoeniE37, PhoeniE60, PhoeniE69 a PhoeniE108) a po jednom mikrosatelitu od marabu afrického (Lcru109) a volavky žlutozobé (Ae52) a jeden EST ptačí mikrosatelit (TG09-014). Všechny sedm polymorfních mikrosatelitů jsem také genotypovala na DNA třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče a jsou uvedeny v Tab. 11.

Mikrosatelity nelezené jako polymorfní u potápky roháče v rámci bakalářských prací (Janušová, 2015; Filipová, 2016) jsem amplifikovala při podmínkách, které byly uvedeny ve zmíněných bakalářských pracech a v případě nutnosti jsem upravovala opět teplotu *annealingu*, koncentraci hořčnatých iontů v PCR reakční směsi a délku elektroforetické separace.

Z dvaceti mikrosatelitů od zástupců řádu trubkonosí dva mikrosatelity Pc A107 a Pc B115 od buňáka světlého a jeden mikrosatelit Cd7 od buňáka šedého polymorfismus nevykazovaly, všech šest mikrosatelitů pocházejících od zástupců řádu tučňáci poskytlo polymorfní produkt stejně jako pět konzervovaných ptačích mikrosatelitů a jeden z osmi EST ptačích mikrosatelitů (TG02-120) polymorfismus též nevykazoval.

Celkem jsem tedy otestováním polymorfních mikrosatelitů z bakalářských prací (Janušová, 2015; Filipová, 2016) potvrdila polymorfismus u 42 z nich a vygenotypovala jsem je na třinácti nepříbuzných jedincích potápky roháče, přičemž jsem našla od dvou do dvanácti alel. Tyto mikrosatelity jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11: Charakteristika 42 polymorfních mikrosatelitových lokusů testovaných u 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny název mikrosatelitového lokusu, kód v databázi GeneBank (Acc.no.), zdrojový druh, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel, teplota *annealingu* (T_a) a délka elektroforetické separace (ELFO).

Název lokusu (Acc. no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů 5' → 3'	Jednotka repetice	Počet alel	T_a [°C]	ELFO [min]
Lcru109 neuvedeno	Marabu africký (<i>Leptoptilus crumeniferus</i>)	F: TGCAGGAGCACAAGTAGATG R: AGGGGTAAAAAGCGAAGCTG	GATA	2	62	90
Ae52 JF433927	Volavka žlutozobá (<i>Egretta eulophotes</i>)	F: TGCTGCAAGTAAAGACAACGGA R: TGGGATGAACTCATATTAGACTTGG	GGACA/ GGAAA	4	50	90
PhoeniE37 neuvedeno	Plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>)	F: GCTTGCCACAAGGATAGG R: AGCCCTGAATTGGTCAGG	GAATA	7	61	90
PhoeniE60 neuvedeno		F: CACTTGGAGACTGAATCC R: CTTGCTTCTTGTACCTCC	GAAA/ GACA	4	58	90
PhoeniE69 neuvedeno		F: ATTGGACAATGGCACCTC R: AGCTCTATGTCTTATCTTG	CTT	9	56	180
PhoeniE108 neuvedeno		F: CTGGAAGACATCTGCTG R: AGCAGAAGCTCTTACTC	CTTT/TT/ CTT	4	46	180
Pc B109 JX435475	Buňňák světlenohý (<i>Puffinus carneipes</i>)	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATTTCAGGATGTAGGTTC	CAA	12	56	120
Pc D3 JX435478		F: CCTCTGCTCAAGTCTGTCCAC R: AAACCTCCTTTGGGATGA	GATA/ GAAA	3	58	120
Pc D103 JX435479		F: GGAAAGATGTCATGCTGATGA R: GTGGGAGATTCATAGGCAAAG	GATA/ GATG	2	64	90
Patbel2 JF288776	Buňňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	F: GGTGTCATGCAACTGACTGAA R: CAATGGGAATGGCAGAGACT	CTAT	6	65	90
Pacbel_17986 neuvedeno		F: ATAACCCAGTGTGATGGTGC R: CACAGCTGCTTAGTGCACAG	GT	2	68	90

Tab. 11: Pokračování 1.

Název lokusu (Acc. no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů 5' → 3'	Jednotka repetice	Počet alel	T _a [°C]	ELFO [min]
Bb11 HM171894	Buňák Bulwerův (<i>Bulweria bulwerii</i>)	F: CTGGCATCAGTCCCTTACCT R: GCTCTTACGAATCCGCTACC	GA	3	67	90
Bb21 HM171897		F: CTGATGTTCCAGGCCCTAAT R: CCTCTGAGCCAGCTAATTCC	TG	7	63	150
Parm03 EU360820	Buňák trinidadský (<i>Pterodroma arminjoniana</i>)	F: CTTGCTGGGTTTTGTTGGTT R: AATTGCTCAGGGAGGTGCT	CA/TA	5	56	90
Tch6 nevedeno	Buňák taiko (<i>Pterodroma magentae</i>)	F: CAATGGGAATGGCAGAGACT R: CAATGGGAATGGCAGAGACT	GT/GC	4	58	90
Cd9 ** EU029091	Buňák šedý (<i>Calonectris diomedea</i>)	F: AATAACCGCCTGACCAAATG R: TGAACCTCACCTGTGTCTGC	TG	9	44	180
Dc27 AF096807	Albatros šedohlavý (<i>Diomedea chrysostoma</i>)	F: CACCCATTTTTGCAGTTCAC R: TCCCCTTGCTTGTGATTATG	AC	2	50	90
Dc5 AF096790		F: AGGAGGGAACTTCTCCAG R: AGCAGGGAGTGACTTGAGGAG	AC/CAC	4	58	90
De7 AF096792	Albatros stěhovavý (<i>Diomedea exulans</i>)	F: GAGGAAAACCTCCATCTGCCA R: TCTGAACCTCTATCAAAGG	AC	3	58	90
STAL8 nevedeno	Albatros bělohřbetý (<i>Phoebastria nigripes</i>)	F: CCCTGCTGGGTTTCATTC R: CATTGTGTCAGTAGGCATGG	TG	2	60	90
Oc49 * FJ238098	Buňáček madeirský (<i>Oceanodroma castro</i>)	F: TGCTTCTGGATTTGTTTTGC R: CAAACCGTGTGACCCAGATA	CA	2	53	120
Omn8 * JQ303232	Buňáček Monteiroův (<i>Oceanodroma monteiroi</i>)	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTA	AC	9	47	90
Ol10-39 FJ238106	Buňáček dlouhokřídlý (<i>Oceanodroma leucorhoa</i>)	F: TTAAGAACAGAGCCTGACTTG R: ACAAATCTCATGTCCCTTG	GT	8	60	90
Ech005 FM878336	Tučňák žlutorohý (<i>Eudyptes chrysolophus</i>)	F: GCCTTATGCAGGTACAGATGTCTTCTC R: TGCTGAAGGTAAAGAGCAGTGAAATC	CTTTT	9	44	90

Tab. 11: Pokračování 2.

Název lokusu (Acc. no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů 5' → 3'	Jednotka repetice	Počet alel	T _a [°C]	ELFO [min]
Ech009 FM878340	Tučňák nejmenší (<i>Eudyptula minor</i>)	F: CCTCTGTTGTACAAGCTGGATGC R: GCAATTCTGCTTGCCTCTGC	AC	2	69	180
Em1 KM272221		F: TCCAGCTGAGTTGTATGACTTC R: CCCTGTGAGTATAGAGCCTGG	ATCT	4	53	120
Em14 KM272230		F: CAGGAGTGAACCCAAAGCTG R: AGGTACCGAGGGAAGCAAAG	CAA	2	67	180
Em21 KM272232		F: CCACATTCATCCACAGGCAG R: CCTCGCAGGGAATATTTGGC	CT	2	59	90
Emm5 DQ837733		F: ATTAACCTGGCCTTGGGTTTC R: TTTATGCTCCCTCATTCCAC	CTTT	3	56	120
CAM-11 nevedeno	Konzervované ptačí mikrosatelity	F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGRGAGCGGATG	GT	5	59	90
CAM-17 ** nevedeno		F: CGGGTTGTAATCAAGAAGATGC R: CTGCGGAGCAATTAACGC	TG	6	52	150
CAM-19 nevedeno		F: TCTTGAGGCAGATARGAAGTG R: GAGCAAGCAAAGATCACAAGC	GT	3	65	150
CAM-23 nevedeno		F: CTCCACTTAGCTTGTAATGCAC R: CCAAGRAGTGCCCTAGATGTC	TG	6	62	120
CAM-24 nevedeno		F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	CA	5	55	90
TG03-098 DV573670	EST ptačí mikrosatelity	F: TTTGCCTTAATTCTTACCTCATTG R: TTGCAACCTCTGTGGAAGC	AG	2	56	90
TG04-012 CK306810		F: TGAATTTAGATCCTCTGTTCTAGTGTC R: TTACATGTTTACGGTATTTCTCTGG	GT	2	67	90
TG04-061 ** CK235034		F: GACAATGGCTATGAAATAAATTAGGC R: AGAAGGGCATTGAAGCACAC	A/GA	6	55	150

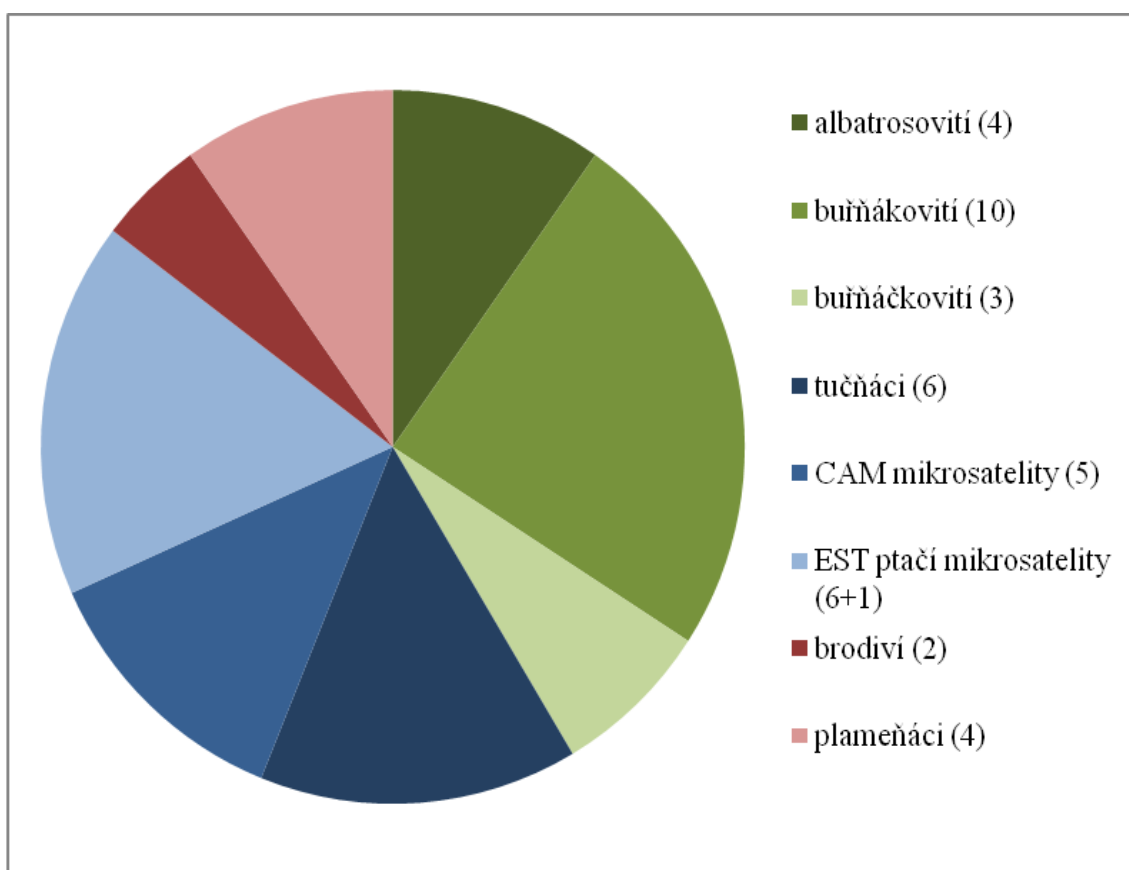
Tab. 11: Pokračování 3.

Název lokusu (Acc. no.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů 5' → 3'	Jednotka repetice	Počet alel	T _a [°C]	ELFO [min]
TG06-009 CK315728	EST ptačí mikrosatelity	F: AAGCCTTGCTTACATTTTATGGTG R: GGGGTGGTAACTGAAATAAAGTATAGG	AC/GT/ AT	3	56	90
TG11-011 CK308096		F: ACAAACTAAGTACATCTATATCTGAAC R: TAAATACAGGCAACATTGG	AT	2	58	90
TG01-040 DV576233		F: TGGCAATGGTGAGAAGTTTG R: AGAATTTGTACAGAGGTAATGCACTG	AT	3	65	90
TG03-002 DV575298		F: TCTTGCCTTTTTGGTATAGAGTATAG R: TACAAAGCACTGTGGAGCAG	AT	5	54	90
TG09-014 DV948892		F: CCAAAGGTGAAGGAATCTATGG R: TCTGCCTGCAGAGTCCAAC	AT/AG	2	50	90

Legenda: * – poloviční koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi (1,5 mmol/l) oproti koncentraci ve standardním PCR mixu (3 mmol/l); ** – dvoutřetinová koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi (2 mmol/l) oproti koncentraci ve standardním PCR mixu (3 mmol/l).

Mikrosatelity nalezené jako polymorfní nebo u nichž byl polymorfismus potvrzen, jsou rozděleny co do řádu nebo čeledi, od které byly původně odvozeny, jsou zobrazeny v Grafu č. 1.

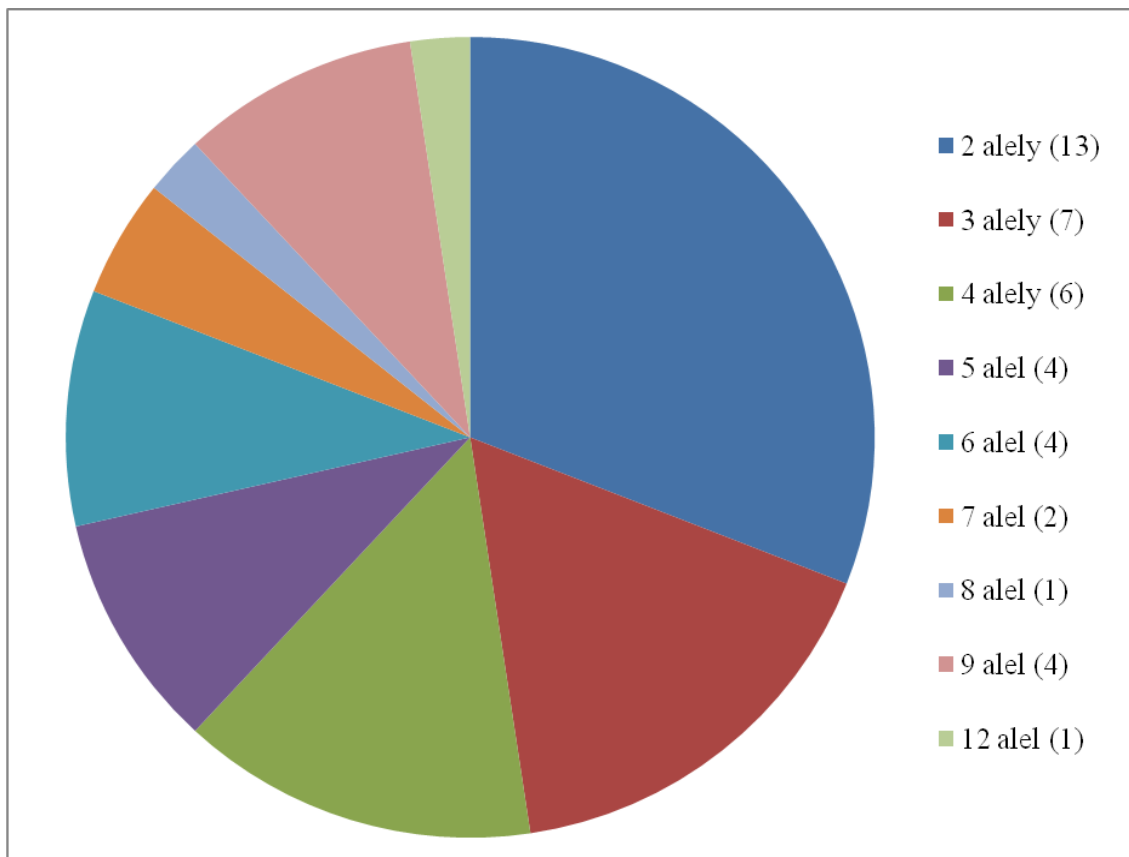
Graf č. 1: Rozdělení 42 polymorfních mikrosatelitů co do řádu respektive čeledi, ze které byly původně odvozeny. Čísla odpovídají počtu polymorfních lokusů u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Čeledi z řádu trubkonosí, od nichž odvozené mikrosatelity byly polymorfní, jsou značeny zeleně, polymorfní mikrosatelity od zástupců řádu tučňáci, konzervované ptačí mikrosatelity a EST ptačí mikrosatelity jsou značeny modře a mikrosatelity (brodiví ve smyslu tradičního systému a plameňáci), u kterých byl zjištěn polymorfismus v této práci jsou značeny červeně (šest mikrosatelitů, přičemž sedmý je zahrnut v rámci EST ptačích mikrosatelitů).



Necelá třetina (13 ze 42) mikrosatelitů, které vykazovaly polymorfismus měla u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče pouze dvě alely, zbylých 29 polymorfních mikrosatelitů mělo od tří do dvanácti alel, přičemž čím větší počet alel mikrosatelit měl, tím bylo těchto mikrosatelitů méně, s výjimkou čtyř mikrosatelitů,

kteře měly po devíti alelách a s tímto trendem tedy nekorelují. Rozdělení nalezených polymorfních lokusů co do počtu alel je uvedeno v Grafu č. 2.

Graf č. 2: Rozdělení nalezených 42 polymorfních lokusů co do počtu alel u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče původně navržených pro zástupce řádu trubkonosí, tučňáci, brodiví, plameňáci, tučňáci a dále EST ptačí mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity. Čísla uvedená v závorkách udávají počty jednotlivých polymorfních mikrosatelitů s danými počty alel.



Všechny (42) nalezené polymorfní mikrosatelitové lokusy byly vygenotypovány na třinácti nepříbuzných jedincích potápky roháče a měly od dvou do dvanácti alel, v průměru 4,476 alel na lokus. Získaná data byla analyzována pomocí softwaru Cervus 3.0.3, kde kompletní údaje pro jednotlivé lokusy uvádím v příloze č. 1. Z výsledků vyplývá, že průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,5705, pokud by všech těchto 42 mikrosatelitů bylo použito pro paternitní studie, v případě, že bychom neznali ani jednoho z rodičů, ke kterému bychom přiřazovali mládě, je pravděpodobnost chyby $9,27 \cdot 10^{-6}$, pokud by byl jeden rodič známý, je pravděpodobnost chybného určení druhého rodiče $1,161 \cdot 10^{-9}$ a pravděpodobnost špatného přiřazení mláděte k rodičovskému páru by činila $8,114 \cdot 10^{-16}$. Pravděpodobnost, že by na všech těchto 42

lokusech měli dva jedinci stejné genotypy je $2,5 \cdot 10^{-29}$ a pravděpodobnost, že by se našla dvě mlád'ata, která by měla na 42 lokusech stejné genotypy je $1,816 \cdot 10^{-12}$.

Kromě této diplomové práce bylo již dalších 42 polymorfních mikrosatelitů (42 polymorfních lokusů vznikajících amplifikací 41 párů primerů) popsáno v diplomové práci (Hoffmannová, 2013). Celkem je tedy známo pro potápku roháče 84 polymorfních mikrosatelitů. Pro všechny tyto lokusy jsem opět provedla analýzu v programu Cervus 3.0.3. Průměrný počet alel na lokus byl 4,26, průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,5496, co se týče použití všech těchto mikrosatelitů pro paternitní studie, v případě, že bychom neznali ani jednoho z rodičů, ke kterému bychom mládě přiřazovali, byla by chyba o pět řádů menší ($5,114 \cdot 10^{-10}$), pravděpodobnost chyby v případě znalosti jednoho z rodičů a hledání druhého by byla nižší o osm řádů ($2,26 \cdot 10^{-17}$) a pravděpodobnost špatného přiřazení páru rodičů by klesla na hodnotu $7,542 \cdot 10^{-29}$. Pravděpodobnost stejného genotypu u všech 84 lokusů u dvou jedinců by činila $8,199 \cdot 10^{-55}$ a pravděpodobnost stejných genotypů na všech lokusech u dvou mlád'at by byla $3,534 \cdot 10^{-23}$.

Všech 84 polymorfních lokusů jsem podrobila analýze softwarem Genepop 4.1 a ten i přes nastavení nejpřísnějších kritérií výpočtů nezjistil, že by mezi nějakou dvojicí lokusů byla vazba.

U lokusů, které jsem vygenotypovala jsem se snažila zjistit, zda nejsou vázané na pohlaví, konkrétně na chromozom Z. U ptáků nesou samci dvě kopie stejného pohlavního chromozomu (ZZ) a samice mají chromozomy různé (ZW), samice tedy nikdy nevykazují heterozygotní konstituci. V mnou zpracovávaném vzorku byla DNA sedmi samců a šesti samic potápky roháče a na základě tohoto předpokladu jsem mezi testovanými mikrosatelity našla šest lokusů pravděpodobně na pohlaví (Z chromozom) vázaných. Tři z nich vykazovaly velmi nízkou heterozygotnost a navíc měly pouze dvě alely (Pacbel_17896 a TG04-012A) a v případě lokusu Bb11 tři alely. Proto by bylo zapotřebí otestovat je na větším počtu jedinců, aby bylo možné vazbu na pohlaví potvrdit nebo naopak vyloučit. Dále vykazovaly vazbu na pohlaví mikrosatelitový lokus OI10-39 (8 alel – všech sedm samců heterozygotních a všech šest samic homozygotních), mikrosatelitový lokus CAM-11 (5 alel – šest ze sedmi samců heterozygotních a všech šest samic homozygotních) a mikrosatelit PhoeniE108 (4 alely – čtyři ze sedmi samců heterozygotní a všech šest samic homozygotních). U těchto tří mikrosatelitů je pravděpodobnost vazby na pohlaví velmi vysoká, ovšem stoprocentně by ji potvrdili jen další testy na větším množství jedinců.

Na základě této diplomové práce jsem ke čtyřem mikrosatelitům (B8, E202, PgAAT8 a Sv2A-95), které byly určeny jako nejlepší pro determinaci paternity u potápky roháče v rámci diplomové práce (Hoffmannová, 2016) doplnila další tři devítialelové mikrosatelity (Omn8, Ech005 a PhoeniE69), které měly dobře hodnotitelné produkty, vysokou heterozygotnost, velmi nízkou až žádnou frekvenci výskytu nulových alel, neodchylovaly se od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a poskytují vysokou výpovědní hodnotu pro paternitní studie. Jejich charakteristiku uvádím v Tab. 12 spolu s již uvedenými čtyřmi mikrosatelity, které pro tyto účely vybrala Hoffmannová (2013).

Tab. 12: Charakteristika sedmi vybraných polymorfních mikrosatelitů vhodných pro studium paternity vygenotypovaných u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Ve sloupcích jsou uvedeny název mikrosatelitového lokusu, počet alel, pozorovaná heterozygotnost (H_{obs}), očekávaná heterozygotnost (H_{exp}), obsah polymorfní informace (PIC) a pravděpodobnost výskytu nulových alel (– = bez rizika výskytu nulových alel).

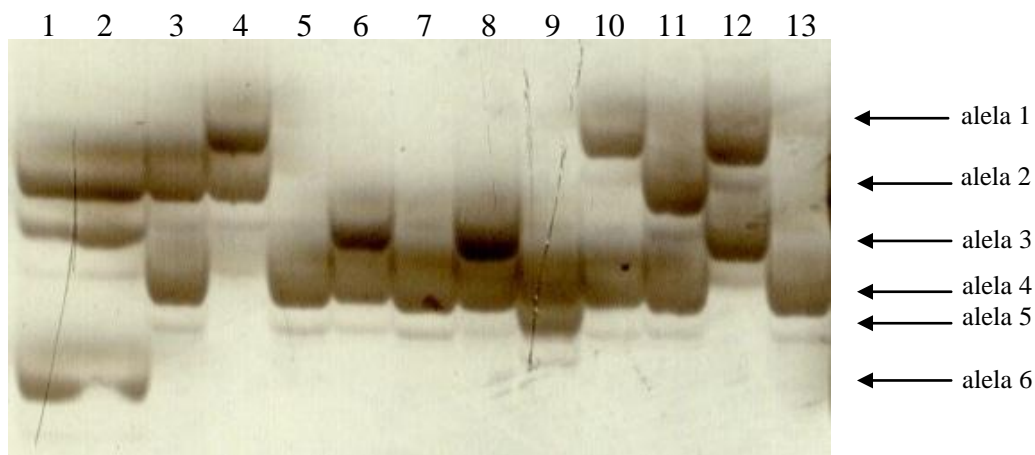
Název mikrosatelitu	Počet alel	H_{obs}	H_{exp}	PIC	Nulové alely [%]
B8*	11	0,923	0,902	0,855	–
E2 02*	10	1,000	0,895	0,846	–
PgAAT8*	10	0,846	0,898	0,850	1,27
Sv2A-95*	9	0,846	0,874	0,821	0,01
Omn8	9	0,846	0,902	0,853	0,90
Ech005	9	0,769	0,843	0,787	3,44
PhoeniE108	9	0,769	0,822	0,769	–

Legenda: * – údaje analýzy Hoffmannová (2013).

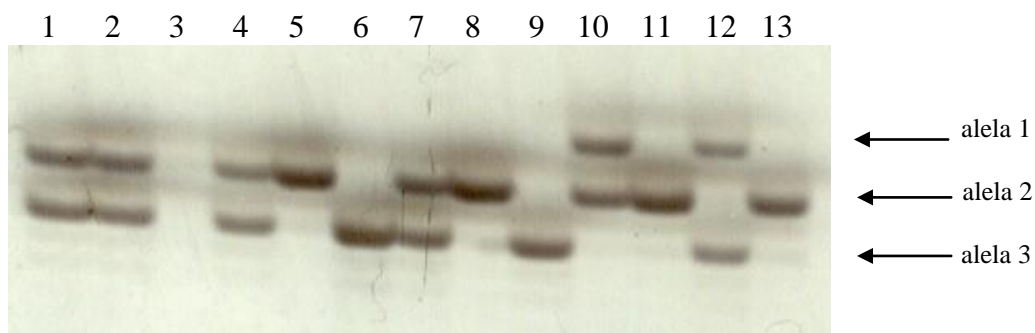
Pro mikrosatelitovém lokusy uvedené v Tab. 12 jsem provedla opět analýzu v programu Cervus 3.0.3, přičemž hodnota průměrného počtu alel na lokus byla 9,571, průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,8765, pravděpodobnost chyby pro nalezení rodičů v rámci paternitních studií by byla $4,85 \cdot 10^{-3}$, pravděpodobnost chyby v případě znalosti jednoho z rodičů a hledání toho druhého by byla $2,3 \cdot 10^{-4}$ a pravděpodobnost špatného přiřazení páru rodičů by byla $6,4 \cdot 10^{-7}$. Pravděpodobnost stejného genotypu u všech sedmi lokusů u dvou jedinců by činila $5,12 \cdot 10^{-4}$ a pravděpodobnost, že by se našla dvě mláďata se stejnými genotypy u všech sedmi lokusů by byla $1,83 \cdot 10^{-10}$.

Na níže uvedených obrázcích jsou zobrazeny výsledky *cross-species* PCR amplifikace a následné elektroforetické separace mikrosatelitu Patbel 2 (viz Obr. 2), TG06-009 (viz Obr. 3) a CAM-24 (viz Obr. 4), kde jsem u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče identifikovala šest, tři a pět alel.

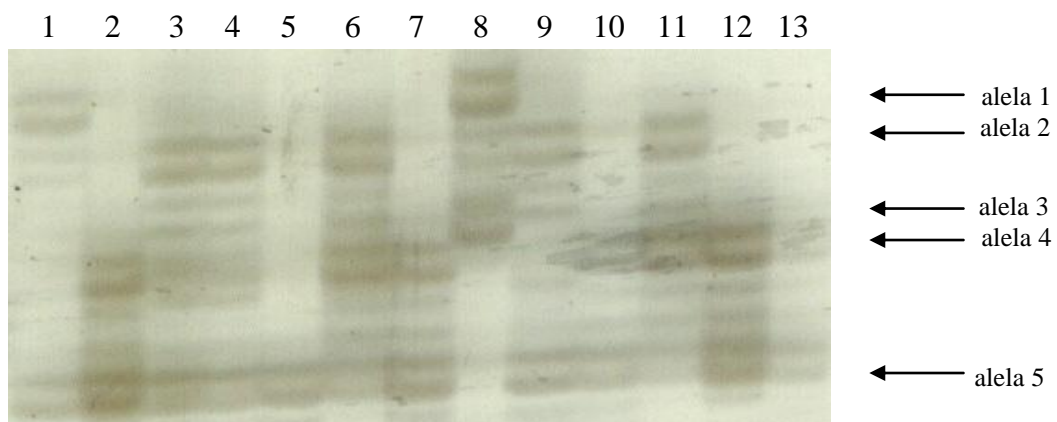
Obr. 2: Elektroforetogram mikrosatelitu Patbel 2 od buňhaka útlozobého u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Čísla označují jedince a šipky alely příslušného mikrosatelitu.



Obr. 3: Elektroforetogram mikrosatelitu TG06-009 ze skupiny EST ptačích mikrosatelitů u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Čísla označují jedince a šipky alely příslušného mikrosatelitu.



Obr. 4: Elektroforetogram mikrosatelitu CAM-24 ze skupiny konzervovaných ptačích mikrosatelitů u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Čísla označují jedince a šipky alely příslušného mikrosatelitu.



6. Diskuze

V této diplomové práci jsem otestovala 30 dosud netestovaných mikrosatelitů u potápky roháče a vybrala z nich ty, které vykazovaly polymorfismus. Tyto vybrané mikrosatelity jsem spolu s mikrosatelity popsány jako polymorfní v bakalářských pracech (Janušová, 2015; Filipová, 2016) vygenotypovala u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče a zjišťovala u nich charakteristiku pomocí populačně genetických programů Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.1 (Rousset, 2008).

V rámci 30 dosud netestovaných mikrosatelitů vykazovalo u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče šest z nich polymorfismus.

Dai *et al.* (2015) popsali u volavky žlutozobé tři polymorfní mikrosatelity, přičemž u mikrosatelitu Ae52 při teplotě *annealingu* 56 °C našli u 133 jedinců čtyři alely. Já jsem u tohoto mikrosatelitu při T_a 50 °C a délce elektroforetické separace 90 minut našla stejný počet alel.

Ferrie *et al.* (2013) izolovali pět mikrosatelitových lokusů u marabu afrického. Mikrosatelit Lcru109 měl při T_a 54 °C u 27 jedinců šest alel a já jsem při teplotě *annealingu* 62 °C a délce elektroforetické separace 90 minut našla u potápky roháče alely dvě.

Dawson *et al.* (2010) popsali 35 univerzálních ptačích mikrosatelitů, kdy u mikrosatelitu TG09-014 našli při T_a 59 °C devět alel, přičemž mikrosatelity byly testovány u 17 různých ptačích druhů. Já jsem u tohoto mikrosatelitu objevila při teplotě *annealingu* 50 °C a délce elektroforetické separace 90 minut alely dvě.

Mikrosatelity od plameňáka karibského byly charakterizovány v rámci diplomové práce (Bauer, 2007) a přišla jsem na ně přes článek Frias-Soler *et al.* (2014), kde autoři použili pouze tři tyto mikrosatelity, shodou okolností ty, které jsem u potápky roháče vyhodnotila jako monomorfní. Diplomová práce Bauer (2007) není dostupná v elektronické podobě a nepodařilo se mi ji sehnat ani jinou cestou, pouze Frias-Soler *et al.* (2014) mi poskytli na moji žádost jednu stranu z této diplomové práce s tabulkou s údaji o čtrnácti mikrosatelitech, které Bauer (2007) popsal. Tabulka kromě názvu mikrosatelitového lokusu udává jednotky repetice (pouze čtyři mikrosatelity jsou dokonalé, zbylé mají sekvenci nedokonalou, přerušovanou či složenou), sekvence primerů a T_a . Dále je zmíněn údaj, které mikrosatelity autor vyhodnotil jako

monomorfní, které jako polymorfní a u kterých polymorfismus pouze předpokládá aniž by je testoval. Snažila jsem se získat sekvence těchto mikrosatelitů z mezinárodních databází, ovšem bez úspěchu. Nemohu tedy získaná data s ničím porovnat.

Srovnáním výsledků těchto prací jsem zjistila, že mikrosatelit AM13 testovala ve své diplomové práci Hoffmannová (2013) a zároveň i Filipová (2016) ve své bakalářské práci a celkové množství doposud testovaných mikrosatelitů u potápky roháče je tedy 823.

Hoffmannová (2013) v rámci své diplomové práce našla celkem 42 polymorfních mikrosatelitů vznikajících amplifikací 41 párů primerů, mikrosatelit PrA104 od plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) (Geraci *et al.*, 2010) amplifikoval dva mikrosatelitové lokusy. Nalezené polymorfní mikrosatelity (Hoffmannová, 2013) měly od dvou do jedenácti alel. Tedy 42 polymorfních mikrosatelitů z celkových 410 testovaných u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče činí úspěšnost 10,2 %, já jsem jich u tohoto druhu našla také 42 z celkových 414 testovaných, tedy 10,1% úspěšnost, z čehož vyplývá, že u potápky roháče bylo charakterizováno celkem 84 polymorfních mikrosatelitů z celkového počtu 823 otestovaných. Celková úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitu tedy činí 10,2 %.

Různé taxonomické skupiny ptáků měly různě velkou úspěšnost poskytnutí polymorfního mikrosatelitu. Navíc ne ze všech skupin byly otestovány všechny existující mikrosatelity, proto by bylo zavádějící uvádět podrobnosti ohledně úspěšnosti těchto skupin (sudokopytníci, vrubozobí a dlouhokřídlí).

Kromě univerzálních ptačích mikrosatelitů a mikrosatelitů od potápek bylo naším cílem otestovat maximum možných mikrosatelitů od příbuzných potápek, tedy od zástupců jednotlivých skupin taxonomického kladu Aequorlitorornithes. Z této skupiny bylo celkem otestováno 749 mikrosatelitů a z nich bylo polymorfních 70, tedy 9,3% úspěšnost.

Rozdělení taxonomických jednotek kladu Aequorlitorornithes je složitější. Je velký rozdíl pokud se zástupci tohoto kladu rozdělí v tradičním pojetí systému (Hudec *et al.*, 1972) a nebo pokud použijeme nejnovější systémy ptáků založené na molekulárních analýzách (Hackett *et al.*, 2008; Prum *et al.*, 2015). Toto rozdělení v tradičním pojetí odráží Tab. 13 a úspěšnosti Graf č. 3, stejná data zasazená do nového pojetí systému vodních ptáků uvádím v Tab. 14 a úspěšnosti v Grafu č. 4.

Z uvedených skupin kladu *Aequorlornithes* pouze u dlouhokřídlých (v tradičně i novém chápání beze změn) bylo otestováno zatím pouze osm mikrosatelitů, z nichž byl jeden polymorfní. Pro tuto skupinu ptáků však existuje odhadem 350–400 mikrosatelitů. Tradiční i nové pojetí systému nechává nezměněný řád potáplice, přičemž z této skupiny bylo u potápky roháče otestováno sedm dosud popsaných mikrosatelitů a polymorfismus nevykazoval žádný. V novém pojetí systému selhali i faetoni, kteří jsou dnes jako samostatná skupina dříve patřící mezi veslonohé. Z jedenácti existujících mikrosatelitů od faetonů nebyl u potápky polymorfní ani jeden.

Tab. 13: Testované mikrosatelity u potápky roháče odvozené od zástupců uvedených řádů a skupin dle tradičního pojetí systému vodních ptáků. Ve sloupcích jsou uvedeny počty testovaných mikrosatelitů v rámci jednotlivých skupin a počet nalezených polymorfních mikrosatelitů. V tabulce jsou uvedeny pouze skupiny, u kterých byly testovány všechny dostupné mikrosatelity, s výjimkou mikrosatelitů od tradičních veslonohých, tradičních brodivých, dlouhokřídlých a vrubozobých, kde bylo testováno pouze uvedených 152, 177, 7 a 13 mikrosatelitů.

Zdrojový řád respektive skupina mikrosatelitů	Počet testovaných mikrosatelitů	Počet polymorfních mikrosatelitů
potápky	18	14
plameňáci	67	11
tradiční veslonoží	152	15
tradiční brodiví	177	6
univerzální ptačí mikrosatelity	60	13
trubkonosí	207	17
tučňáci	113	6
potáplice	7	0
dlouhokřídlí	7	1
vrubozobí	13	1

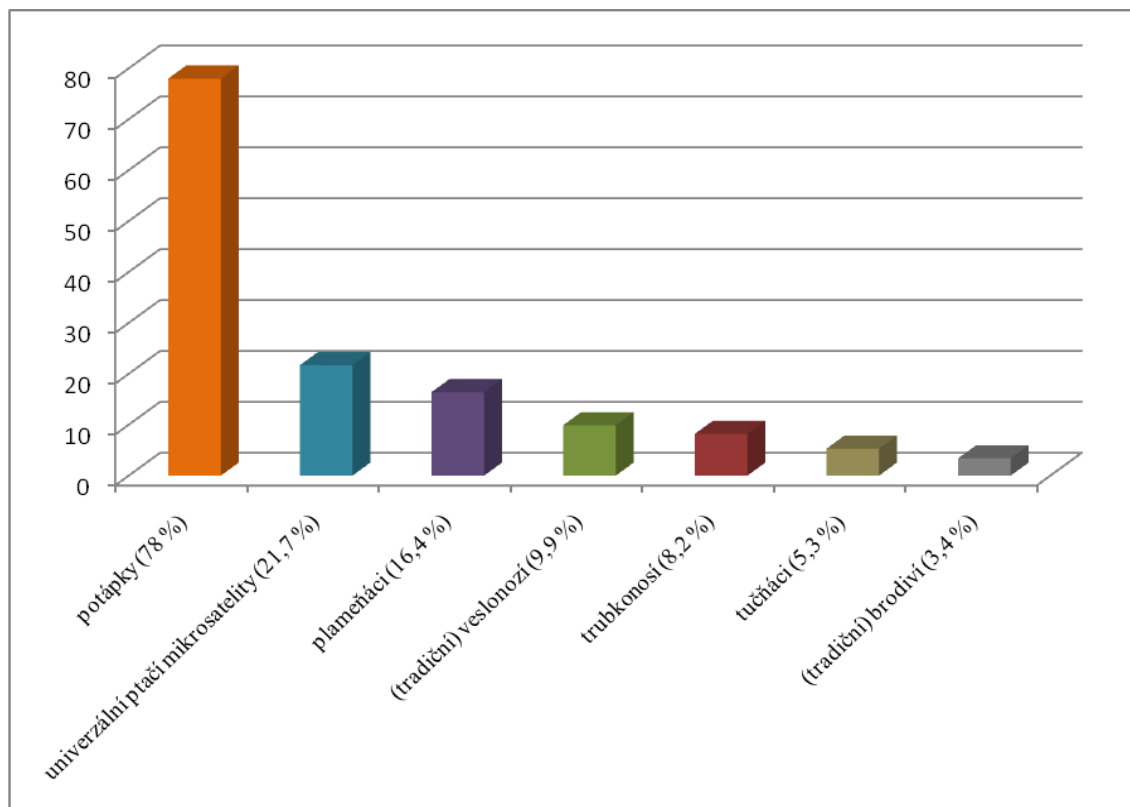
Tab. 14: Testované mikrosatelity u potápky roháče odvozené od zástupců uvedených řádů a skupin dle nového pojetí systému vodních ptáků podle Prum *et al.* (2015). Ve sloupcích jsou uvedeny počty testovaných mikrosatelitů v rámci jednotlivých skupin a počet nalezených polymorfních mikrosatelitů. V tabulce jsou uvedeny pouze skupiny, u kterých byly testovány všechny dostupné mikrosatelity, s výjimkou mikrosatelitů od „dnešních“ veslonohých, „dnešních“ Pelecaniformes a dlouhokřídlých, kde bylo testováno pouze uvedených 122, 155 a 7 mikrosatelitů.

Zdrojový řád respektive skupina mikrosatelitů	Počet testovaných mikrosatelitů	Počet polymorfních mikrosatelitů
potápky	18	14
plameňáci	67	11
„dnešní“ Pelecaniformes	155	12
„dnešní“ veslonoží (Suliformes)	122	8
„dnešní“ Ciconiiformes	41	2
univerzální ptačí mikrosatelity	60	13
trubkonosí	207	17
tučňáci	113	6
dlouhokřídlí	7	1
faetoni	11	0
potáplice	7	0

Celkově tedy v rámci řádu trubkonosí bylo testováno 207 mikrosatelitů, z nichž bylo 17 u potápky roháče polymorfních, což činí úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace 8,2 %. Co se týče testovaných mikrosatelitů ze skupiny univerzálních ptačích mikrosatelitů (CAM, EST), celkem bylo otestováno 60 mikrosatelitů a 13 z nich vykazovalo u potápky roháče polymorfismus, tedy 21,7 % úspěšnost.

Porovnání testovaných skupin mikrosatelitů u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče z hlediska úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace dle tradičního systému vodních ptáků je zobrazeno v Grafu č. 3.

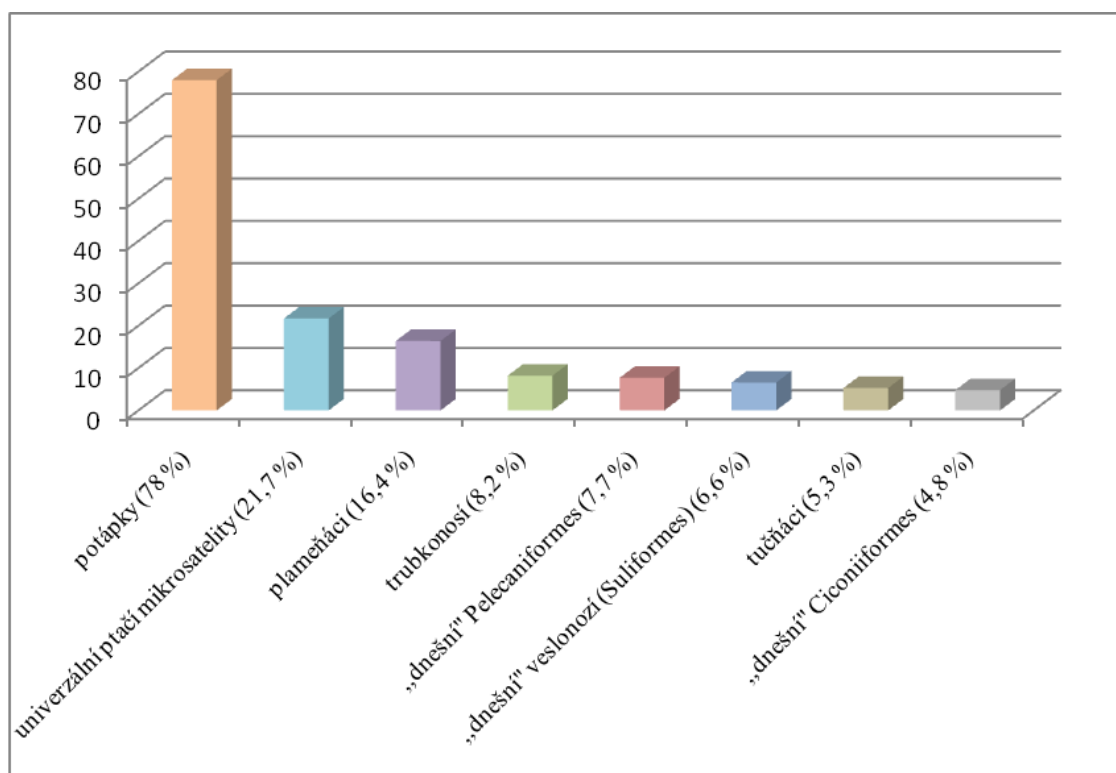
Graf č. 3: Srovnání úspěšnosti testovaných skupin mikrosatelitů na polymorfismus dle tradičního systému vodních ptáků u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Čísla uvedená v závorkách udávají procenta nalezení polymorfního mikrosatelitu v rámci *cross-species* PCR amplifikace u potápky roháče pro danou skupinu mikrosatelitů. V grafu jsou uvedeny pouze skupiny, u kterých byly testovány všechny dostupné mikrosatelity nebo alespoň převážná většina.



Průměrná úspěšnost nalezení polymorfního mikrosatelitu pomocí *cross-species* PCR amplifikace byla 10,2 %. Nadprůměrné z hlediska úspěšnosti byly tedy mikrosatelity pocházející od zástupců řádu potápky, jelikož potápka roháč do této čeledi patří, další v pořadí byly univerzální ptačí mikrosatelity a mikrosatelity od zástupců řádu plameňáci a, naopak podprůměrné z hlediska úspěšnosti byly mikrosatelity od zástupců řádů veslonozí, trubkonosí, tučňáci a brodiví, což odpovídá tradičnímu pojetí systému vodních ptáků.

Porovnání testovaných skupin mikrosatelitů u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče z hlediska úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace v pojetí nového systému vodních ptáků je zobrazeno v Grafu č. 4.

Graf č. 4: Srovnání úspěšnosti testovaných skupin mikrosatelitů na polymorfismus dle nového pojetí systému vodních ptáků (Prum *et al.*, 2015) u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Čísla uvedená v závorkách udávají procenta polymorfismu v rámci *cross-species* PCR amplifikace u potápky roháče pro danou skupinu mikrosatelitů. V grafu jsou uvedeny pouze skupiny, u kterých byly testovány všechny dostupné mikrosatelity nebo alespoň převážná většina.

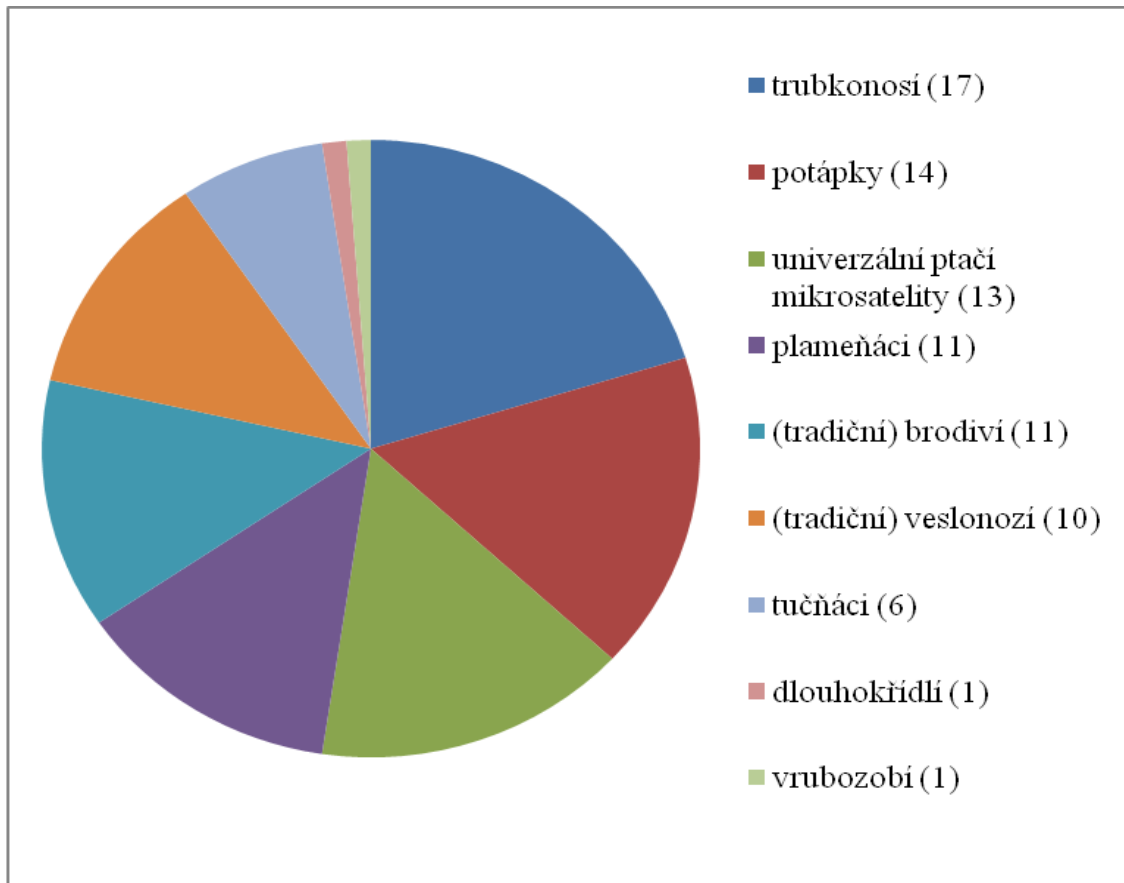


Z hlediska úspěšnosti se ve srovnání v rámci tradičního a nového pojetí systému vodních ptáků na prvních třech pozicích pořadí testovaných skupin mikrosatelitů nezměnilo, mikrosatelity od zástupců řádu trubkonosí byly v rámci starého pojetí systému (Hudec *et al.*, 1972) úspěšnější, naopak u mikrosatelitů od zástupců veslonohých v porovnání s „dnešními“ veslonohými úspěšnost klesla. Mikrosatelity pocházející od zástupců řádu tučňáci zůstaly na stejné pozici. Logická je pozice mikrosatelitů od zástupců řádu plameňáci, které jsou z hlediska úspěšnosti PCR amplifikace (16,4 %) podle Prum *et al.* (2015) sesterskou skupinou potápek.

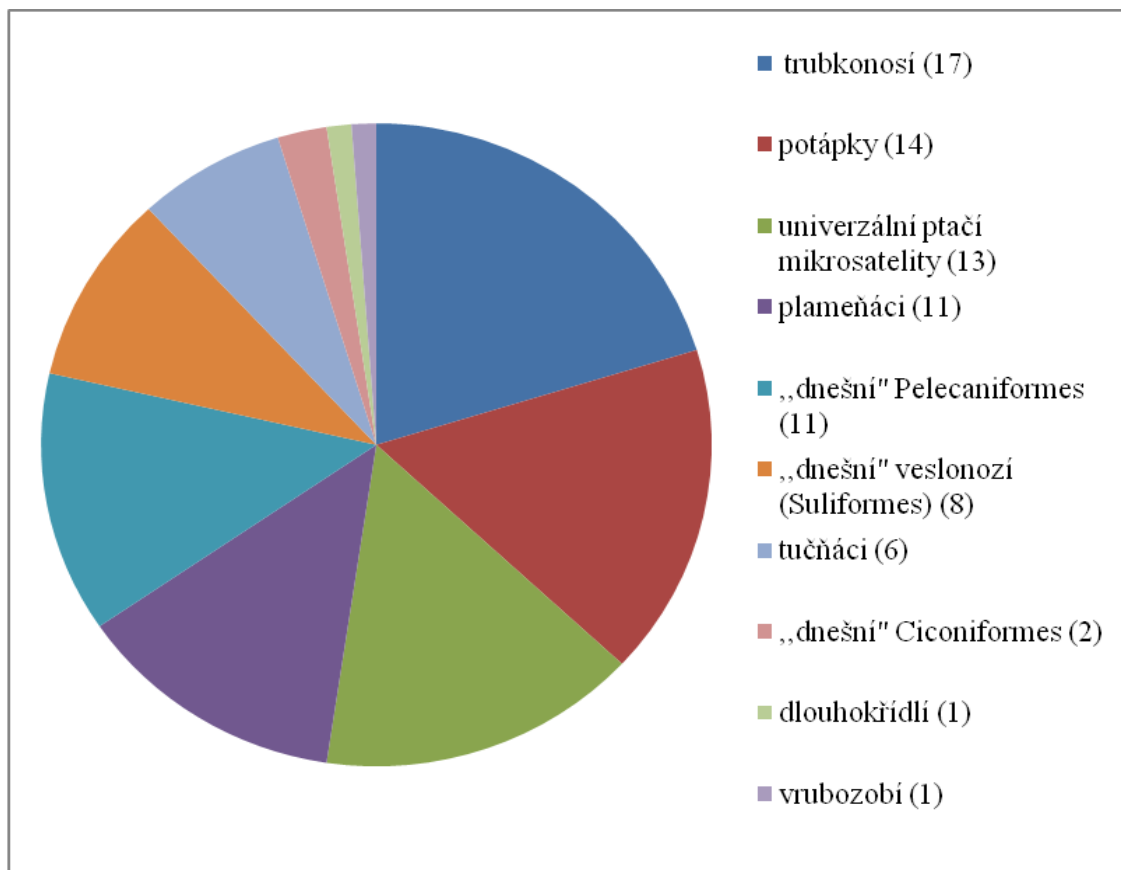
Z celkových 84 polymorfních mikrosatelitů, které vykazovaly u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče polymorfismus jich nejvíce (17) pocházelo od zástupců řádu trubkonosí, dále potom od zástupců řádu potápky (14) a univerzální ptačí mikrosatelity (13). Rozdělení polymorfních mikrosatelitů z hlediska řádů, ze kterých

byly původně odvozeny dle tradičního systému vodních ptáků je zobrazeno v Grafu č. 5 a dle nového systému (Prum *et al.*, 2015) v Grafu č. 6.

Graf č. 5: Rozdělení 84 polymorfních mikrosatelitů u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče na základě řádů, pro jejichž zástupce byly navrženy dle tradičního systému vodních ptáků. Čísla v závorkách udávají počet mikrosatelitů vykazujících polymorfismus v rámci jednotlivých řádů respektive skupin.



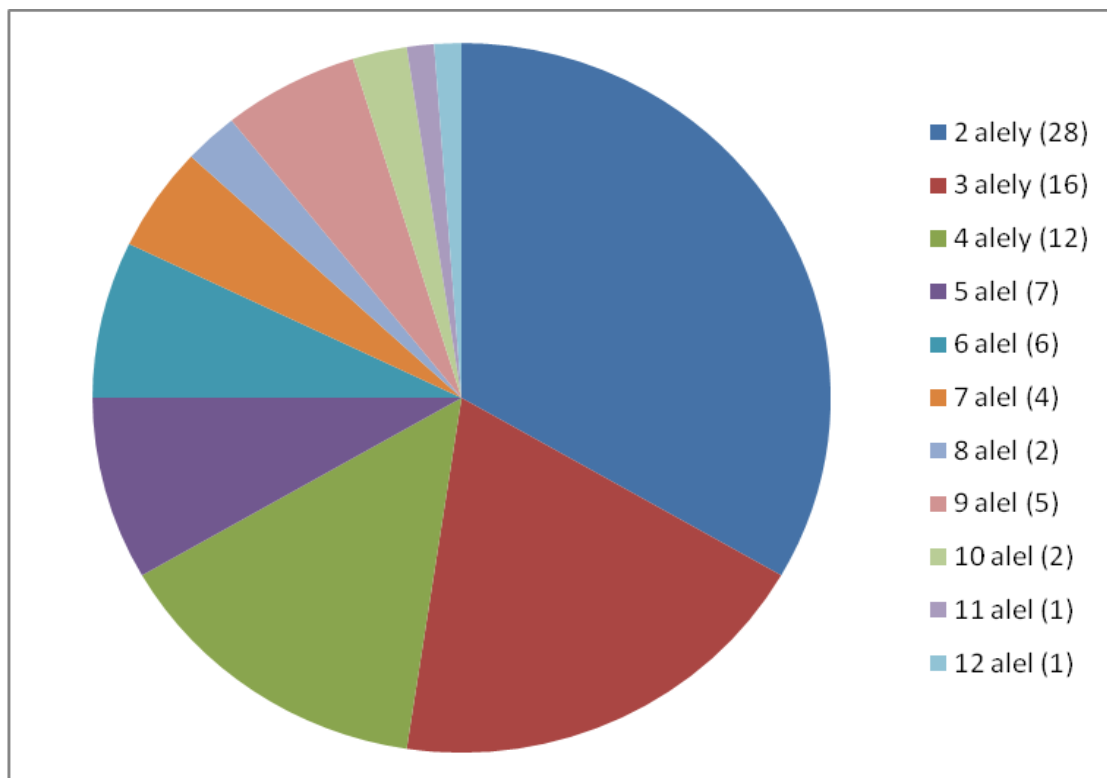
Graf. č. 6: Rozdělení 84 polymorfních mikrosatelitů u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče na základě řádů, pro jejichž zástupce byly navrženy dle nového systému ptáků (Prum *et al.*, 2015). Čísla v závorkách udávají počet mikrosatelitů vykazujících polymorfismus v rámci jednotlivých řádů respektive skupin.



Nejvíce mikrosatelitů vykazujících polymorfismus u potápky roháče pocházelo od zástupců řádu trubkonosí, ale co do úspěšnosti je tato skupina až čtvrtá (testováno 207 mikrosatelitů, z nich polymorfních 17, tedy 8,2% úspěšnost). Velký rozdíl byl zaznamenán také u testovaných mikrosatelitů od zástupců „dnešních“ Ciconiiformes, z nichž polymorfismus vykazovaly pouze dva mikrosatelity a byly na osmém místě, ale co se týče úspěšnosti (7,7 %), v tomto ohledu byly na místě pátém.

Přibližně třetina (28 z 84) všech polymorfních mikrosatelitů nalezených u potápky roháče měla u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče dvě alely, zbylé mikrosatelity měly od tří do dvanácti alel. Rozdělení polymorfních mikrosatelitů z hlediska počtu alel je uvedeno v Grafu č. 7.

Graf č. 7: Rozdělení 84 polymorfních mikrosatelitů z hlediska počtu alel u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče původně navržených pro zástupce z řádu potápky, plameňáci, dlouhokřídli, veslonozí, vrubozobí, tučňáci, brodiví, trubkonosí a EST ptačí mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity. Čísla v závorkách udávají počty jednotlivých polymorfních mikrosatelitů s danými počty alel.



Od zástupců řádů trubkonosí a tučňáci bylo u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče podle bakalářských prací (Janušová, 2015; Filipová, 2016) polymorfních celkem 39 mikrosatelitů, přičemž polymorfismus u třinácti nepříbuzných jedinců jsem v této diplomové práci potvrdila u 36 z nich. Stejně mikrosatelity byly testované v bakalářských pracech (Strejšková, 2016; Zlochová, nepublikováno) u šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského na polymorfismus jich vykazovalo 73 z nich. Většina těchto mikrosatelitů však byla polymorfní u jednoho nebo u druhého druhu, polymorfní u obou druhů bylo pouze dvanáct mikrosatelitů (viz Tab. 13), což je z pohledu potápky roháče přibližně $\frac{1}{3}$ a u plameňáka karibského asi $\frac{1}{6}$ z celkového počtu nalezených polymorfních mikrosatelitů u potápky roháče. Konkrétně se jedná o tři univerzální mikrosatelity, jeden mikrosatelit od tučňáka žlutorohého a osm mikrosatelitů od zástupců řádu trubkonosí. Ve většině případů byl u polymorfních mikrosatelitů u potápky roháče nalezen větší počet alel, což by bylo očekávané vzhledem k většímu počtu testovaných jedinců. Vyjímkou je mikrosatelit Pc D103, kde

bylo u obou druhů shodně nalezeno po dvou alelách a mikrosatelity Bb11 a Oc-49 u kterých bylo u plameňáka karibského více alel než u potápky roháče, v případě Oc-49 dvě respektive tři alely a v případě Bb11 tři respektive pět alel. Předpokládám, že tyto mikrosatelity uvedené v Tab. 13, by mohly být první volbou pro nalezení polymorfních markerů u dalších druhů potápek a plameňáků. Až další testy potvrdí, zda by alespoň některý z nich mohl být takovým vhodným markerem i pro další skupiny kladu *Aequorlitornithes*.

Tab. 13: Mikrosatelity pocházející od zástupců řádu tučňáci, trubkonosí a univerzální ptačí mikrosatelity, které vykazovaly polymorfismus zároveň u potápky roháče a plameňáka karibského. Ve sloupcích jsou uvedeny název mikrosatelitu, zdrojový druh, počet alel u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče (tato práce) a počet alel u šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (Strejčková, 2016; Zlochová, nepublikováno).

Název mikrosatelitu	Zdrojový druh	Potápka roháče (počet alel)	Plameňák karibský (počet alel)
Dc5	Albatros šedohlavý	4	2*
Bb11	Buňňák Bulwerův	3	5*
Bb21		7	2*
Pc B109	Buňňák světlenohý	12	3*
Pc D103		2	2*
Oc-49	Buňňáček madeirský	2	3*
Omn8	Buňňáček Monteirův	9	3*
O110-39	Buňňáček dlouhokřídlý	8	2*
Ech005	Tučňák žltorohý	9	5**
CAM-11	Konzervovaný ptačí mikrosatelit	5	2**
CAM-24		5	4**
TG04-061	EST ptačí mikrosatelit	6	4**

Legenda: * – údaje analýzy Strejčková (2016); ** – údaje analýzy Zlochová (nepublikováno).

V rámci kladu *Aequorlitornithes* by bylo vhodné u potápky roháče otestovat dosud netestovaných 363 mikrosatelitů od zástupců řádu dlouhokřídlí (například Bethrew *et al.*, 2006; Küpper *et al.*, 2007; Farrell *et al.*, 2012), dvanáct mikrosatelitů od kagu chocholatého (*Rhynochetos jubatus*) (Stoeckle *et al.*, 2012), sedm mikrosatelitů od kormorána tasmánského (*Phalacrocorax fuscescens*) (Riordan *et al.*, 2012) a 23

mikrosatelitů od volavky žlutozobé (Dai *et al.*, 2013), kdy z těchto přibližně 400 mikrosatelitů by mohlo být u potápky roháče dalších asi 40 polymorfních.

7. Závěr

V této diplomové práci jsem se věnovala charakteristice vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorornithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). V teoretické části jsem popsala řád potápky, jeho rozdělení na jednotlivé druhy, věnovala jsem se podrobnému popisu potápky roháče, dále fylogenetickému zařazení potápkovitých v systému, mikrosatelitům a nalezeným polymorfním mikrosatelitům u tohoto druhu v rámci dvou bakalářských prací (Janušová, 2015; Filipová, 2016) a jedné diplomové práce (Hoffmannová, 2013). V rámci experimentální části jsem otestovala 30 dosud netestovaných mikrosatelitů u potápky roháče a ty z nich (6), které vykazovaly polymorfismus jsem spolu s polymorfními mikrosatelity ze zmíněných dvou bakalářských prací otestovala a charakterizovala u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče.

Za pomoci *cross-species* PCR amplifikace těchto mikrosatelitů na DNA třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče a následné elektroforetické separace jsem našla celkem 42 polymorfních mikrosatelitů, z nichž sedmnáct jich pocházelo od zástupců řádu trubkonosí, třináct univerzálních ptačích mikrosatelitů, šest mikrosatelitů od zástupců řádu tučňáci, čtyři mikrosatelity od zástupců řádu plameňáci a po jednom mikrosatelitu od zástupců řádu brodiví a veslonoží. U polymorfních mikrosatelitů jsem získaná data zpracovala pomocí programů Cervus 3.0.3 a Genepop 4.1.

Celkově jsem našla 42 polymorfních mikrosatelitů se dvěma až dvanácti alelami, z nichž je šest potencionálně vázaných na pohlaví (Z chromozom). Společně s mikrosatelity, které charakterizovala v rámci své diplomové práce Hoffmannová (2013) je v současné době pro potápku roháče známo 84 polymorfních mikrosatelitů. Analýzou v softwaru Genepop 4.1 jsem zjistila, že mezi nimi není vazba. Velmi úspěšné byly univerzální ptačí mikrosatelity, kterých bylo polymorfních celkem 13 ze 60 testovaných, tedy 21,7% úspěšnost. V rámci testovaných mikrosatelitů z kladu Aequorlitorornithes byla úspěšnost 10,2 %, proto doporučuji otestovat z této skupiny dosud netestované mikrosatelity od dlouhokřídlých, kagu chocholatého, kormorána tasmánského a volavky žlutozobé, kterých je přibližně 400, kdy tyto testy by mohly pro potápku roháče najít dalších asi 40 polymorfních mikrosatelitů.

8. Seznam použitých zkratk

UTR – *untranslated region* (nepřekládaná oblast DNA)

DNA – *DeoxyriboNucleotic Acid* (deoxyribonukleová kyselina)

EST – *Expressed Sequence Tag* (krátká exprimovaná sekvence)

T_a – *Annealing Temperature* (teplota nasedání primerů při PCR reakci)

CAM – *Conserved Avian Microsatellite* (konzervované ptačí mikrosatelity)

9. Použitá literatura

Ahmed, S., Hart, T., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Trathan, N.P., Rogers, A. D. (2009) Isolation and characterisation of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in the other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9: 1530–1535.

Akst, E. P., Boersma, P. D., Fleischer, R. C. (2002) A comparison of genetic diversity between the Galapagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3: 375–383.

Andris, M., Dubois, M. P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010) Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and crossspecies amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, manuskript, publikováno online: <http://biomath.trinity.edu/manuscripts/10-6/mer-10-02pdf>, navštíveno dne 9.10.2016.

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.

Bauer, A. (2007) Isolation polymorphic microsatellites in *Phoenicopterus ruber/P. roseus*. Diplomová práce, Heidelberg, Německo.

Bernatchez, L., Duchesne, P. (2000) Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 1–12.

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

Billing, T. M., Guay, P. J., Peucker, J., Mulder, R. A. (2007) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the study of paternity and population structure in the little penguin *Eudyptula minor*. *Molecular Ecology Notes*, 7: 425–427.

Boessenkool, S., King, T. M., Seddon, P. J., Waters, J.M. (2008) Isolation and characterisation of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources*, 8: 1043–1045.

Bried, J., Andris, M., Dubois, M. P., Jarne, P. (2012) Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 9: 913–915.

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

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

Bruford, M. W., Cheesman, D. J., Coote, T., Green, H. A. A., Haines, S. A., Oryan, C., (1996) Microsatellites and their application to conservation genetics. In: Smith, T.B., Wayne, R.K. (Eds.), *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, Oxford, 278–297.

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

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

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.

Cipriani, G., Lot, G., Huang, W. G., Matarazzo, M. T., Peterlunger, E., Testolin, R. (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation, characterisation and cross species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99:65–72.

Collevatti, R. G., Grattapaglia, D., Hay, J. D. (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10:349–356.

Cregan, B., Mudge, J., Fickus, E. W., Marek, L. F., Danesh, D., Denny, R., Shoemaker, R. C., Matthews, B. F., Jarvik, T., Young, N. D. (1999) Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 919–928

- Dai, Y., Fang, W., Lin, Q., Zhou, X., Chen, X. (2015) A novel multiplex PCR assay for individual identification in the vulnerable Chinese Egret (*Egretta eulophotes*). Conservation Genetic Resources, 7: 635–638.
- Dai, Y., Zhou, X., Fang, W., Lin, Q., Chen, X. (2013) Development and cross-species transferability of 23 microsatellite markers from the vulnerable Chinese Egret (*Egretta eulophotes*) using 454 sequencing. Conservation Genetics Resources 5:1035–1038.
- Dakin, E. E., Avise, J. C. (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity, 93: 504–509.
- Dallimer, M. (1999) Cross-species amplification success of avian microsatellites in the redbilled quelea *Quelea quelea*. Molecular Ecology, 8: 695–698.
- Dawson, D. A., Hanotte, O., Greig, C., Stewart, I. R. and Burke, T. (2000) Polymorphic microsatellites in the blue tit *Parus caeruleus* and their cross-species utility in 20 songbird families. Molecular Ecology, 9: 1941–1944.
- 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.
- Dawson, D.A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martin-Gálvez, D., Stewart, I. R. K., Horsburgh, G. J., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, A. W. J, Preston, S. A. J., Ekblom, R., Slate, J., Burke, T. (2013) High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. BMC Genomics, 14:1–22.
- Dawson, D.A., Horsburgh, G. J., Kupper, C., Stewart, I. K., Ball, A. D., Durrant, K. I., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, Á., Krupa, A. P., Lee, J., Martin-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L. G., Burke, T. (2010) New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. Molecular Ecology Resources, 10: 475–475.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997) Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their uses in population studies. Heredity, 79: 506–514.
- Dayanandan, S., Bawa, K. S., Kesseli, R. (1997) Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). American Journal of Botany, 84: 1658–1663.

- De Ponte Machado, M., Feldheim, 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.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992) *Handbook of the birds of the World*, volume 1. Lynx, Barcelona.
- Dubois, M. P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005) Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, 5: 905–907.
- 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.
- Ellegren H (2004) Microsatellites simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435–445.
- 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 nebouxii*). *Conservation Genetics Resources*, 1: 159–162.
- Farell, L. L., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Burke, T., Lank, D. B. (2012) Isolation, characterisation and predicted genome locations of ruff (*Philomachus pugnax*, AVES) microsatellite loci. *Conservation Genetics Resources*, 4: 763–771.
- Ferrie, G. M., Cohen, O. R., Schutz, P., Leighty, K. A., Plasse, C., Bettinger, T. L., Hoffman, E. A. (2013) Identifying Parentage Using Molecular Markers: Improving Accuracy of Studbook Records for a Captive Flock of Marabu Storks (*Leptoptilus crumeniferus*). *Zoo Biology*, 32: 556–564.
- 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.

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

FitzSimmons, N. N., Moritz, C., Moore, S. S. (1995) Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 432–440.

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*. Oxford University Press, New York.

Frias-Soler, R., Tindle, E., Lopez, G. E., Blomberg, S., Studer-Thiersch, A., Wink, M. (2014) Genetic and Phenotypic Evidence Supports Evolutionary Divergence of the American Flamingo (*Phoenicopterus ruber*) Population in the Galápagos Islands. *Waterbirds*, 37: 349–468.

Friesen, V. L., González, J. A., Cruz-Delgado, F. (2006) Population genetic structure and conservation of the Galápagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Conservation Genetics*, 7: 105–115.

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.

Given, A. D., Mills, J. A., Baker, A. J. (2002) Isolation of polymorphic microsatellite loci from the Red-billed Gull (*Larus novaehollandiae scopulinus*) and amplification in related species. *Molecular Ecology*, 2: 416–418.

Goldstein, D. B., Schlotterer, C. (Eds.) (2003) *Microsatellites: Evolution and application*. Oxford University Press, Eastbourne.

Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2008) Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwater, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1044–1046.

- Gosler, A. (1994) *Atas ptáků světa*, České vydání 1. Příroda, Bratislava.
- Grosser S, Jonathan M, Waters JM (2014) Development and characterisation of 20 novel microsatellite markers for the little blue penguin (*Eudyptula minor*) using next generation sequencing. *Conservation Genetic Resources*, 7:143–145.
- 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 od Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science*, 320: 1763–1768.
- Hancock J. M: Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanism. In: Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (1999): *Microsatellites*. Oxford University Press, Oxford.
- Hanzák, J., Hudec, K. (1963) *Světém zvířat díl II., Ptáci 1, Albatros*, Praha.
- Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2012) Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources*, 5: 27–29.
- 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.
- Hernandez, L. D., Lounsberry, Z. T., Collins, P. W., Henry, R. W., Newsome, S. D., Sacks, B. N. (2014) Development and characterization od 15 polymorphic microsatellite markers for North Pacific albatrosses used paired-end Illumina shotgun sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 6: 491–493.
- 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.
- Howard, R., Moore, A.(1991) *A complete checklist of the birds of the Word*, Second edition, Academic Press, UK.

- 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, X., Zhou, X., Lin, Q., Peng, Z., Fang, W., Chen, X. (2012) A novel multiplex PCR assay for species identification in the Chinese Egret (*Egretta eulophotes*) and Little Egret (*E. garzetta*). *Conservation Genetics Resources*, 4: 31–33.
- Hudec, K. (1994) Fauna ČR a SR, Ptáci 1, Academia – nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Hudec, K., Černý, W. (1972) Fauna ČSSR, Ptáci 1, Academia – nakladatelství Československé akademie věd, Praha.
- Hughes, C. R., Melland, R. R. and Beissinger, S. R. (1998) Polymorphic trinucleotide microsatellite loci for a neotropical parrot, the green-rumped parrotlet, *Forpus passerinus*. *Molecular Ecology*, 7: 1247–1248.
- 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. Diplomová práce, Heidelberg, Německo.
- 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.
- Chapuis, M. P., Estoup, A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 621–631.
- Jakupciak, J. P., Wells, R. D. (2000) I. Genetic instabilities of triplet repeat sequences by recombination. *IUBMB Life*, 50: 355–359.
- Janušová, D. (2016) *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- 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.
- Kang, S., Jung, J.W., Ahn, D. H., Lee, J. E., Kim, J. H., Park, H. (2015) Isolation and characterisation of polymorphic microsatellite loci from the chinstrap penguin, *Pygoscelis antarctica*. *Conservation Genetic Resources*, 7:561–563.
- 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.
- Knapik, E. W., Goodman, A., Ekker, M., Chevrette, M., Delgado, J., Neuhauss, S., Shimoda, N., Driever, W., Fishman, M. C. and Jacob, H. J. (1998) A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics*, 18:338–343.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., Wilson, A. C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86, 6196–6200.
- Küpper, C., Horsburgh, G. J., Dawson, D. A., French-Constant, R., Szekely, T., Burke, T. (2007) Characterization of 36 polymorphic microsatellite loci in the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) including two sex-linked loci and their amplification in four other Charadrius species. *Molecular Ecology Notes*, 7: 35–39.
- Labuschagne, C., van Wyk, A. M., Kotze, A., Grobler, P., Dalton, D. L. (2013) Isolation and characterisation of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). *Conservation Genetic Resources*, 5: 169–171.
- Lawrence, H. A. (2008) Conservation Genetics of the World's Most Endangered Seabird, the Chatham Island Tāiko, doktorská práce, Auckland, Nový Zéland.
- 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.
- 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.

- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., Leblond, S., Earle Macdonald, J., De Jong, J., Wieringa, B. (1992) Myotonic dystrophy mutation: An unstable CTG repeat in the 38 untranslated region of the gene. *Science*, 255:1253–1258.
- 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.
- 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.
- Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimand, a G. K., Thali, M. R., Alderman, R., Cuthbert, R. J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Philips, R. A., Ryan, P. G., Suazo, C., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015) Evolutionary factor affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15:1046–1058.
- Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M. and Hetzel, D. J. S. (1991) The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. – *Genomics*, 10: 654
- Morin PA, Mahboubi P, Wedel S and Rogers J (1998) Rapid screening and comparison of human microsatellite markers in baboons: Allele size is conserved, but allele number is not. *Genomics*, 53: 12–20.
- 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.
- O'Donnell, W. T., Warren, S. T. (2002) A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Neurosciences*, 25:315–338.

- Oliviera, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellite. *Genetic and Molecular Biology*, 29: 294–307.
- 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.
- Pemberton, J. M., Slate, J., Bancroft, D. R., Barrett, J. A. (1995) Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4: 249–252.
- 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. Doktorská práce, University of North Texas, USA.
- Primmer, C. R., Moller, A. P. and Ellegren, H. (1996) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5: 365–378.
- Prum, R. O., Jacob, S., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J.P., Lemmon, E. M., Lemmon A. R. (2015) A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next generation DNA sequencing. *Nature*, 526: 569–573.
- Quilfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012) Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153: 367–373.
- Rassmann, K., Schlötterer, C., Tautz, D. (1991) Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12: 113–118.
- Reece, K. S., Ribeiro, W. L., Gaffney, P. M., Carnegie, R. B., Allen, S. K. Jr. (2004) Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. *Journal of Heredity*, 95: 355–361.
- Rew, M. B., Peery, Z., Beissinger, S. R., Bérubé, M., Lozier, J. D., Rubidge, E. M., Palsboll, P. J. (2006) Cloning and characterisation of 29 tetranucleotide and two dinucleotide polymorphic microsatellite loci from the endangered marbled murrelet (*Brachyrampuhus marmoratus*). *Molecular Ecology Notes*, 6: 241–244.

- Rico, C., Rico, I., Hewitt, G. (1996) 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of Royal Society of London B: Biological Sciences*, 263: 549–557.
- Richards, R.I., Sutherland, G.R. (1994) Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nature Genetics*, 6: 114–116.
- Riordan, J., Gardner, M. G., Fitch, A. J., Johnston, G. (2012) Isolation, via 45 sequencing, and characterisation of microsatellite for *Phalacrocorax fuscescens*, the black-faced cormorant (Aves: Phalacrocoracidae). *Australian Journal of Zoology*, 60: 340–342.
- Roa, A. C., Chavarriaga-Aguirre, P., Duque, M. C., Maya, M. M., Bonierbale, M. W., Iglesias, C., Tohme, J. (2000) Cross species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany*, 87:1647–1655.
- 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 Adelidae penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10: 1645–1656
- Rose, O. and Falush, D. (1998) A threshold size for microsatellite expansion, *Molecular Biology Evolution*, 15: 613–615.
- Rousset, F. (2008) GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- Rubinsztein, D. C., Amos, W., Leggo, J *et al.* (1995) Microsatellite evolution Evidence for directionality and variation in rate between species. *Nature Genetics*, 10, 337–343.
- Sachs, J. L., Hughes, C. R. (1999) Characterisation of microsatellite loci for red-necked nebes *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.
- Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., Zhang, C. (2010) MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics*, 11:143.

- Shephard, J. M., Galbusera, P., Hellemans, B., Jusic, A., Akhandaf, Y. (2009) Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics*, 10: 1525–1528.
- Schlosser, J. A., Dubach, J. M., Garner, T. W. J., Araya, B., Bernal, M., Simeone, A., Smith, K. A., Wallace, R. S. (2008) Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin. *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetics*, 10: 839–849.
- Schlosser, J. A., Garner, T. W. J., Dubach, J. M., McElligott, A. G. (2003) Characterisation of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, 3: 62–64.
- Schlötterer, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365–371.
- Schlötterer, C., Amos, W., Tautz, D. (1991) Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, 354: 63–65.
- Sibley, C. G., Ahlquist, J. E. (1990) Phylogeny and classification of birds. A study in molecular evolution. Yale University Press, New Haven.
- Spurgin, L. G., Illera, J. C., Jorgensen, J. H., Dawson, D. A., Richardson, D. S. (2014) Genetic and phenotypic divergence in an island bird: isolation by distance, by colonization or by adaptation? *Molecular Ecology*, 23: 1028–1039.
- Stai, S. M., Hughes, C. R. (2003) Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics*, 34: 387–389.
- Stallings, R. L. (1994) Distribution of trinucleotide microsatellites in different categories of mammalian genomic sequence: Implication for human genetic diseases. *Genomics*, 21:116–121.
- Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E and Glossl J (1997) Conservation of (GA)(n) microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*, 6:1189–1194.
- Stoeckle, B. C., Theuerkauf, J., Rouys, T., Gula, R., Lorenzo, A., Lambert, Ch., Kaeser, T., Kuehn, R. (2012) Identification of polymorphic microsatellite loci for the endangered Kagu (*Rhynochetos jubatus*) by high-throughput sequencing. *Journal of Ornithology*, 153: 249–253.

Strejčková, B. (2016) *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. *Molecular Ecology Resources*, 9: 913–915.

Svensson, Mullarney, K., Zetterstrom, D. (2016) Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého východu, druhé vydání, překlad Svenssona, Vydavatelství Ševčík, Plzeň.

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.

Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004) Characterization of microsatellite loci in White-chinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes*, 4: 33–35.

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.

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

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 of London B: Biological Sciences*, 268: 1345–1350.

Walsh, P.S., Fildes, N. J., Reynolds, R. (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus VWA. *Nucleic Acids Research*, 14: 2807–2812.

Wang, Z., Zhou, X., Lin, Q., Fang, W., Chen, X. (2011) New primers for sex identification in the Chinese Egret and other Ardeid species. *Molecular Ecology Resources*, 11:176–179.

- 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.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011) Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources*, 5: 581–584.
- White, G., Powell, W. (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): An endangered tropical hardwood species. *Molecular Ecology*, 6:851–860.
- Wright, J. M., Bentzen, P. (1994) Microsatellites: Genetic markers of the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4:384–388.
- 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.
- Zaccara, S., Crosa, G., Vanetti, I., Bineli, G., Childres, B., McCulloch, G., Harper, D. M. (2011) Lesser Flamingo *Phoeniconaias minor* as a nomadic species in African shallow alkalit lakes and pans: genetic structure and future perspectives, diploma thesis.
- Zane, L., Bargelloni, L., Paternello, T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1–16.

10. Přílohy

Příloha č. 1: Výsledná analýza 42 polymorfních mikrosatelitů u třinácti nepříbuzných jedinců potápky roháče v programu Cervus 3.0.3. Ve sloupcích jsou uvedeny název mikrosatelitového lokusu, počet alel (k), počet testovaných jedinců (N), pozorovaná heterozygotnost (HObs), očekávaná heterozygotnost (HExp), obsah polymorfni informace (PIC), NE-1P, NE-2P, NE-PP, NE-I, NE-SI, soulad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou (NS= v souladu, ND= nelze hodnotit) a pravděpodobnost výskytu nulových alel F (Null).

Mikrosatelitový lokus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (Null)
Ae52	4	13	0.538	0.582	0.510	0.835	0.679	0.512	0.243	0.531	NS	0.0626
Bb11	3	13	0.154	0.385	0.324	0.932	0.824	0.713	0.443	0.676	ND	0.4122
Bb21	7	13	0.462	0.754	0.696	0.662	0.477	0.275	0.105	0.414	NS	0.2244
CAM-11	5	13	0.308	0.785	0.715	0.649	0.471	0.287	0.100	0.398	NS	0.4225
CAM-17	6	13	0.923	0.846	0.787	0.550	0.373	0.196	0.062	0.359	ND	-0.0634
CAM-19	4	13	0.462	0.643	0.561	0.798	0.640	0.473	0.203	0.492	NS	0.1596
CAM-23	6	13	0.923	0.671	0.590	0.764	0.602	0.420	0.181	0.473	NS	-0.2069
CAM-24	4	13	0.846	0.735	0.654	0.718	0.549	0.375	0.139	0.431	NS	-0.1049
Cd9	9	13	0.538	0.908	0.859	0.413	0.258	0.102	0.030	0.321	ND	0.2404
Dc27	2	13	0.308	0.369	0.292	0.937	0.854	0.769	0.479	0.692	ND	0.0714
Dc5	4	13	0.692	0.723	0.639	0.730	0.564	0.390	0.149	0.440	NS	-0.0024
De7	3	13	0.154	0.151	0.140	0.989	0.926	0.863	0.736	0.862	ND	-0.0310
Ech005	9	13	0.769	0.843	0.787	0.538	0.364	0.180	0.059	0.359	NS	0.0344
Ech009	2	13	0.462	0.517	0.374	0.876	0.813	0.720	0.376	0.596	NS	0.0370
Em21	2	13	0.231	0.323	0.262	0.952	0.869	0.787	0.523	0.726	ND	0.1475
Em1	4	13	0.615	0.674	0.592	0.771	0.608	0.435	0.180	0.471	NS	0.0113
Em14	2	13	0.154	0.148	0.132	0.990	0.934	0.881	0.746	0.866	ND	-0.0319
Emm5	3	13	0.462	0.465	0.376	0.900	0.795	0.680	0.377	0.621	NS	-0.0267

Příloha č. 1: Pokračování.

Mikrosatelitový lokus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (Null)
Lcru106	2	13	0.231	0.323	0.262	0.952	0.869	0.787	0.523	0.726	ND	0.1475
Oc-49	2	13	0.400	0.526	0.375	0.875	0.813	0.719	0.375	0.594	NS	0.1111
OI10-39	8	13	0.538	0.858	0.803	0.519	0.346	0.169	0.053	0.351	ND	0.2055
Omn8	9	13	0.846	0.902	0.853	0.426	0.268	0.109	0.032	0.325	ND	0.0090
Pacbel_17896	2	13	0.154	0.148	0.132	0.990	0.934	0.881	0.746	0.866	ND	-0.0319
Parm03	5	13	0.769	0.702	0.616	0.747	0.586	0.412	0.165	0.454	NS	-0.0778
Patbel2	6	13	0.769	0.738	0.673	0.691	0.510	0.316	0.121	0.425	NS	-0.0291
PcB109	12	13	0.538	0.815	0.770	0.553	0.372	0.167	0.061	0.373	NS	0.1789
PcD103	2	13	0.538	0.471	0.350	0.898	0.825	0.734	0.402	0.624	NS	-0.0866
PcD3	3	13	0.385	0.674	0.573	0.790	0.645	0.496	0.199	0.476	NS	0.2446
PhoeniE108	4	13	0.231	0.723	0.639	0.730	0.564	0.390	0.149	0.440	NS	0.4937
PhoeniE37	7	13	0.692	0.834	0.775	0.562	0.385	0.201	0.066	0.366	NS	0.0659
PhoeniE60	4	13	0.231	0.532	0.459	0.864	0.722	0.567	0.291	0.567	NS	0.3674
PhoeniE69	9	13	0.769	0.822	0.769	0.563	0.384	0.189	0.065	0.371	NS	-0.0102
STAL8	2	13	0.385	0.508	0.369	0.881	0.815	0.722	0.381	0.601	NS	0.1186
TG01-40	3	13	0.692	0.612	0.504	0.827	0.701	0.559	0.254	0.519	NS	-0.0952
TG03-098	2	13	0.308	0.271	0.226	0.966	0.887	0.811	0.581	0.765	ND	-0.0803
TG04-012	7	13	0.385	0.843	0.785	0.549	0.373	0.193	0.062	0.360	ND	0.3563
TG04-12A	2	13	0.077	0.077	0.071	0.997	0.964	0.933	0.860	0.928	ND	-0.0107
TG04-061	7	13	0.462	0.806	0.743	0.607	0.428	0.240	0.082	0.383	NS	0.2656
TG06-009	3	13	0.462	0.563	0.456	0.853	0.738	0.605	0.295	0.553	NS	0.0899
TG09-014	2	13	0.077	0.077	0.071	0.997	0.964	0.933	0.860	0.928	ND	-0.0107
TG11-011	2	13	0.154	0.271	0.226	0.966	0.887	0.811	0.581	0.765	ND	0.2570
Tch6	4	13	0.231	0.345	0.310	0.943	0.822	0.695	0.468	0.701	ND	0.1657

Number of individuals:	13
Number of loci:	42
Mean number of alleles per locus:	4.476
Mean proportion of loci typed:	0.9945
Mean expected heterozygosity:	0.5705
Mean polymorphic information content (PIC):	0.5024
Combined non-exclusion probability (firstparent):	0.00000927
Combined non-exclusion probability (second parent):	1.161E-0009
Combined non-exclusion probability (parent pair):	8.114E-0016
Combined non-exclusion probability (identity):	2.511E-0029
Combined non-exclusion probability (sib identity):	1.816E-0012