

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



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů  
z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů  
u potápky roháče (*Podiceps cristatus*)**

**Bakalářská práce**

**Kristýna Filipová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2016**

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

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

V Olomouci dne 5. května 2016

.....

Děkuji vedoucímu bakalářské práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval při vedení teoretické i praktické části mé bakalářské práce. Dále děkuji kolektivu Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za jejich pomoc a zpříjemnění pracovního prostředí.

## Souhrn

V mé bakalářské práci jsem řešila polymorfismus u potápky roháče (*Podiceps cristatus*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů získaných od druhů z řádu tučňáci, konzervovaných ptačích mikrosatelitů a EST ptačích mikrosatelitů.

V teoretické části jsem se zabývala popisem řádu potápky (Podicipediformes) a zařazením do systému, dále popisem potápky roháče. Popsala jsem mikrosatelity, jejich *cross-species* PCR amplifikace a doposud objevené mikrosatelity u druhů řádu tučňáci, konzervované ptačí mikrosatelity a ptačí EST mikrosatelitové sekvence.

V praktické části jsem testovala 171 mikrosatelitů na *cross-species* PCR amplifikaci u potápky roháče. 113 testovaných mikrosatelitů bylo izolováno z devíti druhů řádu tučňáci, 34 EST mikrosatelitů a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Na testování jsem použila genomickou DNA od šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče.

Díky následné elektroforetické separaci jsem objevila celkem 19 polymorfních mikrosatelitů. Šest mikrosatelitů pochází z řádu tučňáci, od tučňáka nejmenšího a žlutorohého. Pět polymorfních konzervovaných ptačích mikrosatelitů a zbývajících osm EST polymorfních mikrosatelitů. Polymorfní mikrosatelity měly 2-8 alel. U polymorfních mikrosatelitů jsem určila optimální podmínky pro PCR reakci (teplotu *annealingu* a koncentraci hořčnatých iontů) a délku elektroforetické separace.

## Summary

I dealt with polymorphism of Crested Grebe (*Podiceps cristatus*) using the method of cross-species PCR amplification testing microsatellites from representatives of order of Sphenisciformes, EST avian microsatellites and conserved avian microsatellites in my bachelor thesis.

In the theoretical part I described order Podicipediformes, their taxonomy and description of the Crested Grebe. I dealt microsatellites, their cross-species PCR amplification and previously discovered microsatellites isolated from representatives of order of Sphenisciformes, EST avian microsatellites and conserved avian microsatellites.

In the experimental part I tested 171 pairs of primers for cross-species PCR amplification of Crested Grebe. 113 of tested primer pairs were isolated from nine species of Sphenisciformes, 34 of EST avian microsatellites and 24 of conserved avian microsatellites. I used a genomic DNA from six unrelated individuals of Crested Grebe.

I have discovered 19 polymorphic microsatellites loci. Six of them have been from two species of the order of Sphenisciformes (Little Blue Penguin – *Eudyptula minor* and Macaroni Penguin – *Eudyptes chrysolophus*). Another five have been conserved avian microsatellites and the least eight have been EST avian microsatellites. Polymorphic microsatellites had 2-8 alleles. I determined optimal conditions for PCR amplification of polymorphic microsatellites (annealing temperature and concentration of magnesium ions) and the time of electrophoretic separation.

# Obsah

1	Úvod .....	7
2	Cíl práce.....	8
3	Literární přehled .....	9
3.1	Řád potápky .....	9
3.1.1	Potápka roháč .....	10
3.2	Mikrosatelity .....	13
3.2.1	Mikrosatelity popsané u zástupců řádu tučňáci.....	15
3.2.2	Polymorfní EST mikrosatelity.....	24
3.2.3	Konzervované ptačí mikrosatelity.....	26
4	Materiál a metody.....	27
4.1	Biologický materiál .....	27
4.2	Polymorfní mikrosatelity testované u potápky roháče .....	27
4.2.1	PCR amplifikace.....	30
4.2.2	Elektroforetická separace a vizualizace PCR produktů .....	31
4.3	Použité chemikálie .....	33
4.4	Použité roztoky.....	34
4.5	Laboratorní přístroje.....	35
5	Výsledky.....	37
6	Diskuze .....	46
7	Závěr.....	54
8	Seznam použitých zkratk .....	55
9	Použitá literatura.....	56

# 1 Úvod

Potápka roháč (*Podiceps cristatus*) je jedním z přibližně 20 druhů potápek, které tento řád zahrnuje. V teoretické části mé bakalářské práce se budu zabývat právě tímto druhem – jeho charakteristikou a rozšířením. Potápka roháč je uvedena v Červeném seznamu IUCN v kategorii málo dotčený druh (vemi malé nebo žádné obavy z vyhynutí; Anonymous, 2012). Dále budu popisovat mikrosatelity. Budu se zabývat jejich charakteristikou a využitím. Zaměřím se na mikrosatelity od tučňáků, jimiž se budu zabývat i v praktické části – budu hledat polymorfní mikrosatelity u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče pomocí *cross-species* PCR amplifikace 171 mikrosatelitů: 113 mikrosatelitů z řádu tučňáci, 34 ptačích EST mikrosatelitů a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Na téma hledání polymorfních mikrosatelitů u potápky roháče pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace byly již v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci napsány bakalářské a diplomové práce, které byly úspěšné v hledání polymorfních mikrosatelitů od jiných skupin kladu Aequorlitorinithes. Tato práce bude první, která otestuje u potápky roháče mikrosatelity od tučňáků a univerzálních ptačích mikrosatelitů (včetně ptačích EST mikrosatelitů).

## 2 Cíl práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
3. PCR amplifikace DNA potápky roháče s využitím *cross-species* primerů, které jsou známé u zástupců řádu tučňáci, dále ptačích EST mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.
4. U polymorfních mikrosatelitů určit teplotu *annealingu*, čas elektroforetické separace PCR produktů a početl alel.



## 3 Literární přehled

### 3.1 Řád potápky

Řád potápky (Podicipediformes) je menší řád ptáků, který zahrnuje podle Howard *et al.* (1991) 21 druhů v pěti rodech:

- 1) rod *Podiceps*: potápka velká (*P. major*), šedohlavá (*P. poliocephalus*), novozélandská (*P. rufopectus*), nejmenší (*P. dominicus*), rudokrká (*P. griseogen*), roháč (*P. cristatus*), žltorohá (*P. auritus*), černokrká (*P. nigricollis*), stříbřitá (*P. occipitalis*), Taczanowského (*P. taczanowskii*) a chocholatá (*P. gallardoi*);
- 2) rod *Aechmophorus*: potápka západní (*A. occidentalis*) a mexická (*A. clarkii*);
- 3) rod *Podilymbus*: potápka šedá (*P. podiceps*) a obrovská (*P. gigas*);
- 4) rod *Rollandia*: potápka Rollandova (*R. rolland*) a krátkokřídlá (*R. micropterum*);
- 5) rod *Tachybaptus*: potápka australská (*T. novaehollandiae*), malá (*T. ruficollis*), madagaskarská (*T. pelzelni*) a skořicovohrdlá (*T. rufolavatus*).

Hudec *et al.* (1972) dělí potápky na čtyři rody, které mají celkem 20 druhů. Gaisler *et Zima* (2007) i del Hoyo *et al.* (1992) dělí potápky na šest rodů a 22 druhů. Autoři navíc zahrnují rod *Poliocephalus*, kam řadí potápku šedohlavou a novozélandskou, dále uvádějí již vymřelou potápku andskou (*Podiceps andinus*) a potápku nejmenší (*Podiceps dominicus*) vyjímají z rodu *Podiceps* a přearazují do rodu *Tachybaptus*.

Potápky žijí po celém světě, nejvíce druhů se vyskytuje v Severní a Jižní Americe. V České republice žije pět druhů potápek (potápka černokrká, malá, roháč, rudokrká a žltorohá), běžně se vyskytují tři druhy (potápka černokrká, malá a roháč) (Gaisler *et Zima*, 2007).

Potápky jsou přizpůsobeny k vodnímu životu a potápění. Jsou to štíhlí ptáci, většinou mají na hlavě barevné vějířky a korunky z peří (Fjeldså, 2004). Velikostí jsou rozmanité, váží 140-1200 g. Menší druhy se podobají kachnám. Jejich zobák je úzký, ostrý a špičatý. Ocas mají zakrnělý. Na noze mají plovací blánu, na každém prstě kožovitý lem a plochý dráp (největší je na prostředním prstu). Potápky mají přizpůsobené tělo k rychlému potopení – mají velice pohyblivé nohy, při potopení je vysunou před tělo a křídla přitisknou k bokům (Hudec *et al.*, 1972).

Malé druhy potápek se živí hmyzem a drobnými rybami, žijí na celém světě v různých vodách. Větší druhy potápek se živí rybami a vyskytují se na jezerech. Potápky jsou pro příjem potravy různě specializované – některé dokážou probodnout rybu svým zobákem například potápka západní, jiné se specializují na lov hmyzu. Potápky, až na rybožravé druhy, jsou sociální živočichové. Druhy žijící ve stejné zeměpisné šířce se mezi sebou mohou lišit druhem přijímané potravy (Fjeldsá, 2004). Mají dobře vyvinutý pylorický oddíl v žaludku. Je zajímavé, že asi ze ¾ bývá naplněn peřím. Může se jednat o mechanickou ochranu trávicího traktu nebo ochranu před předčasným únikem potravy ze žaludku. (Hudec *et al.*, 1972).

Ve vodním prostředí tráví celý život. Mezi vodní vegetací stavějí svá hnízda z rostlin. Mají charakteristické projevy tokání. Mláďata umějí ihned po vylíhnutí plavat, mají však nedokonalou termoregulaci, proto je rodiče vozí na zádech. Mláďata některých druhů se po vylíhnutí vracejí k odpočinku na své hnízdo, například potápka malá. Potápky jsou polokrmivé – rodiče mláďatům potravu loví a vkládají do zobáku, později pouze podávají. Množivost u potápek je nízká a následkem je kolísání počtu jedinců (Hudec *et al.*, 1972; Fjeldsá, 1994).

Let potápek je velice rychlý, ale ne příliš obratný. Aby mohly vzlétnout, musejí se rozběhnout po hladině. Jsou častou kořistí dravců, proto přelétají hlavně v noci. Některé druhy schopnost létat ztratily, například potápka Taczanovského a Rollandova. Pokud jsou potápky v ohrožení, ponořují se pod hladinu. Největším nebezpečím je pro potápky změna ekosystému, ve kterém žijí, kvůli jejich potravní specializaci (Fjeldsá, 1994).

### 3.1.1 Potápka roháč

Potápka roháč (*Podiceps cristatus*) – starší název: roháč velký (Šťastný *et al.* 1998) – je jedním z druhů našich potápek. Je uvedena v Červeném seznamu IUCN v kategorii málo dotčený druh (vemi malé nebo žádné obavy z vyhynutí), který byl vydán v roce 2012 (Anonymous, 2012). Je to tažný pták s délkou těla 46-51 cm a váhou 600-700 g. Pro tento druh potápky je charakteristický límeček okolo krku, který má oranžovo-červené zbarvení, a černé peří ve tvaru růžků na hlavě, boky hlavy jsou bílé (Burnie, 2008). Mají dlouhý, štíhlý, bílý krk, jejich zobák je dýkovitý (Burnie, 2008). Potápka vydává hlasité *örrr, körr-arr*, při tokání *kök*, hladová mláďata vydávají *bilibilibi* (Hudec *et al.*, 1972).

Živí se rybami a menšími živočichy (hmyz a jeho larvy, měkkýši, vzácně užovky a žáby). Dokáže ulovit ryby velké až 22 cm. Denní příjem je přibližně 150-250 g potravy (del Hoyo *et al.*, 1992). Většinu potravy loví při ponoru, pod vodou vydrží až minutu (Burnie, 2008).

Preferuje rozsáhlé vodní plochy se sladkou a braktickou vodou a rostlinami. Hnízda stavějí obě pohlaví z vodních rostlin mezi rákosím (Burnie, 2008). Mohou však i plavat nebo dosedat na dno v mělkých vodách (Hudec *et al.*, 1972). Většinou se vyskytují osamocené hnízdící páry, vzácně mohou být pohromadě až desítky hnízdících párů (Fjeldsá, 1994). Samička klade v dubnu až srpnu 3-5 vajec, průměrně na jeden pár však připadá 1,2-1,5 mláděte (Šťastný *et al.*, 1998). O mláďata se starají a krmí oba rodiče (Fjeldsá, 1994) – viz obrázek č. 1. Začínají létat v 71-79 dnech, pohlavně dospělá jsou ve dvou letech (Šťastný *et al.*, 1998). Jsou světlá, s tmavými proužky na tvářích a tmavým temenem.

**Obrázek č. 1:** Potápka roháč pečující o potomstvo (zdroj: <https://cs.wikipedia.org/>).



Pro potápku roháče je charakteristický zásunbní tanec. Dvoření potápek probíhá ve vodě, pár potápek se ponořuje a loví zbytky rostlin. Potřásají hlavami ze strany

na stranu, třou se vzájemně o hrud', pak rychle plavou za vydávání charakteristických zvuků (Burnie, 2008).

Gaisler *et Zima* (2007) řadí potápku roháče do systému takto:

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

Dále se druh potápka roháč podle Howard *et al.* (1991) a del Hoyo *et al.* (1992) dělí do tří poddruhů:

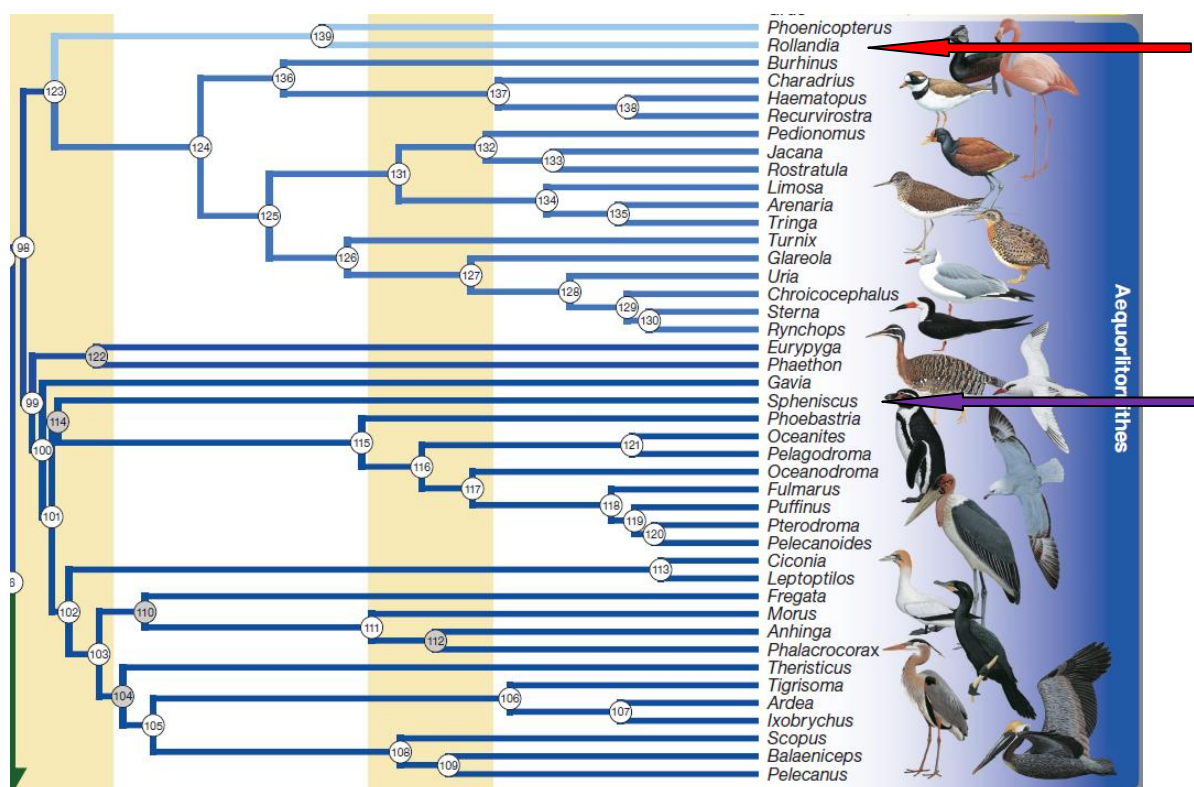
*Podiceps cristatus cristatus* – výskyt od Evropy po Čínu, Indie, severní Afrika

*Podiceps cristatus infuscatus* – výskyt od Senegalu po Etiopii, Kapská provincie

*Podiceps cristatus australis* – výskyt jižní Austrálie, Tasmánie, Nový Zéland

Systém velkých vodních ptáků je stále nejasný. Podle nejnovější studie fylogeneze provedené Prum *et al.* (2015) založené na next-generation DNA sekvencování, patří potápka (společně s řádem tučňáci) do kladu Aequorlornithes. Do tohoto kladu patří také řády: plameňáci, dlouhokřídlí, slunatci, potáplice, faetoni, trubkonosí, čápi, terejové, ibisi, volavky, veslonozí (v užším slova smyslu) a pelikáni (v širším slova smyslu – spolu s člunozobcem a kladivoušem; viz obrázek č. 2). V poslední době došlo k promíchání tradičních řádů (například veslonozí a brodiví). Je otázkou budoucího výzkumu, jak budou řády v rámci kladu Aequorlornithes nově rozděleny.

**Obrázek č. 2:** *Fylogenetický klad Aequirornithes (zdroj: Prum et al., 2015).*



**Legenda:**

červená šipka – řád potápky,

fialová šipka – řád tučnáci.

### 3.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity (Simple Sequence Repeats – SSRs), jsou krátké tandemové repetice (Short Tandem Repeats – STRs) s jednotkou opakování o délce 1-9 párů nukleotidů. Mikrosatelitové lokusy jsou rozšířené u eukaryot i prokaryot, v kódujících i nekódujících oblastech (Lawson *et* Zhang, 2006). Pokud jsou mikrosatelity přítomny v kódujících oblastech, zvyšují pravděpodobnost změny replikace a transkripce, která vede ke změnám na molekulární úrovni a následně ke změnám sekvencí v DNA (Karunasena *et al.*, 2015).

Mikrosatelity mají široké spektrum využití a jsou nejběžněji používaným genetickým markerem od konce 20. století (Bruford *et* Wayne, 1993). Ještě před několika lety, byly mikrosatelity považovány za selektivně neutrální markery a myslelo se, že nepodléhají selekčnímu tlaku. Nyní je známo, že různý počet repetic v mikrosatelitech může způsobit různá onemocnění (Huntingtonova choroba; Oliveira *et al.*, 2006). Jsou vhodné pro studium populace a otcovství, pro důkaz fylogenetických

analýz (Hauser *et al.*, 2011), pro genetickou identifikaci, určování klonů, ploidie a hybridů (Hansson *et al.*, 2012). Pro určité účely jsou mikrosatelity výhodnější než bialelické markery (například jednonukleotidové polymorfismy – SNPs, Gärke *et al.*, 2012).

Oliveira *et al.* (2006) dělí mikrosatelity podle vzájemného uspořádání repetičních jednotek na dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené:

- Dokonalé repetice nejsou přerušované. Jedná se například o motiv TATATATATATATA.
- U nedokonalých repetic je pár bází vložen do repetitivního (dokonalého) motivu, například TATATATACTATATA.
- Přerušované mikrosatelity jsou sekvence bází, kde je mikrosatelit přerušen jinou sekvencí (dvěmi a více bázemi). Příklad přerušované sekvence je TATATACGTGTATATATA.
- U složených mikrosatelitů se vyskytují dva mikrosatelity za sebou, například TATATATATAGTGTGTGTGT.

Warshney *et al.* (2005) popisují dva způsoby hledání mikrosatelitů:

- Prvním způsobem je hledání mikrosatelitů *de novo*. Tento způsob je časově náročný a pracný. Genomická DNA je naštípána restriční endonukleázou. Následuje elektroforetická separace, kde jsou fragmenty rozděleny podle své velikosti. Fragmenty, délky několika set nukleotidů, se naklonují do plazmidového vektoru, transformují se do bakterie a nechají se pomnožit. Pak se selektují klony obsahující repetice pomocí hybridizace s jednou či více sondami, které obsahují danou repetici. Sekvence s repetitivní DNA se osequencuje a navrhnu se primery pro PCR amplifikaci. Důležité je i zhodnocení objevených mikrosatelitů – určení jejich vypovídací hodnoty (zkouška polymorfizmu, výpočet parametrů, vzájemná vazba mikrosatelitů, Hardy-Weinbergova rovnováha).
- Druhým způsobem jsou *cross-species* PCR amplifikace. U mikrosatelitů, které byly nalezeny *de novo* pro určitý druh, se testuje polymorfizmus na nepříbuzných jedincích. Pokud je mikrosatelit polymorfní, následuje určení genotypu, ideálně se pomocí *cross-species* PCR amplifikace testuje 20 nepříbuzných jedinců, na jejichž základě určíme vypovídající hodnotu mikrosatelitu, očekávanou a pozorovanou heterozygotnost, frekvenci nulových

alel, případně vzájemnou vazbu (v případě více mikrosatelitů). S rostoucí fylogenetickou vzdáleností účinnost *cross-species* PCR amplifikace klesá (Scribner *et* Pearce, 2000).

Typem mikrosatelitů jsou i EST (expressed sequence tag) mikrosatelity. Pocházejí z transkribované sekvence DNA. Výhoda EST mikrosatelitů je větší míra přenositelnosti mezi druhy (Li *et al.*, 2012).

I přes to, že jsou mikrosatelity značně využívány, stále nejsou objasněny jejich mutace. Mutační rychlost mikrosatelitů je mnohem vyšší než u jiných částí genomu. Mutační rychlost mikrosatelitů je v rozmezí  $10^{-2}$ - $10^{-6}$  nukleotidů na lokus na jednu generaci (Schlötterer *et* Tautz, 1992). Pro vysvětlení mutací mikrosatelitů již bylo navrženo několik mechanismů – chyby během rekombinace, nerovnoměrný *crossing-over* a sklouznutí polymerázy během DNA replikace nebo opravy řetězce DNA (Strand *et al.*, 1993).

Jedna z nevýhod mikrosatelitů je časová a finanční náročnost jejich izolace. Další nevýhodou jsou problémy s amplifikací u nulových alel mikrosatelitů. Jsou to takové alely, které nelze amplifikovat pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Nulové alely mají mutaci v místě DNA, na které nasedá primer. Nulové alely výrazně narušují statistické informace o mikrosatelitech, negativně ovlivňují jejich hodnocení (Dakin *et* Avise, 2004). Dají se odhalit použitím jiného primeru, který je posunut o několik bází.

### 3.2.1 Mikrosatelity popsané u zástupců řádu tučňáci

Do řádu tučňáci (Sphenisciformes) patří 17 recentních druhů, které jsou rozděleny do šesti rodů (Davis, 2015):

- rod: *Aptenodytes*: tučňák patagonský (*A. patagonicus*) a císařský (*A. forsteri*);
- rod: *Eudyptes*: tučňák chocholatý (*E. sclateri*), královský (*E. schlegeli*), novozélandský (*E. pachyrhynchus*), skalní (*E. chrysocome*), snárský (*E. robustus*) a žlutorohý (*E. chrysolophus*);
- rod: *Eudyptula*: tučňák nejmenší (*E. minor*) a bělopásý (*E. albosignata*);
- rod: *Megadyptes*: tučňák žlutooký (*M. antipodes*);
- rod: *Pygoscelis*: tučňák kroužkový (*P. adeliae*), oslí (*P. papua*) a uzdičkový (*P. antarctica*);

- rod: *Spheniscus*: tučňák brýlový (*S. demersus*), galapážský (*S. mendiculus*), Humboldtův (*S. humboldti*) a magellanský (*S. magellanicus*).

Doposud bylo v 10 studiích u devíti druhů tučňáků popsáno 113 mikrosatelitů. Tyto mikrosatelity byly izolovány od druhů: tučňák brýlový, galapážský, Humboldtův, kroužkový, magellanský, nejmenší, uzdičkový, žlutooký, žlutorohý (viz tabulka č. 1)

**Tabulka č. 1:** Mikrosatelity popsané u druhů řádu tučňáci. V tabulce je uveden druh tučňáka, počet doposud popsanych mikrosatelitů a literární zdroj.

Druh tučňáka	Počet mikrosatelitů	Literární zdroj
Tučňák žlutorohý ( <i>Eudyptes chrysolophus</i> )	25	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
Tučňák nejmenší ( <i>Eudyptula minor</i> )	8	Billing <i>et al.</i> , 2007
	20	Grosser <i>et al.</i> , 2014
Tučňák žlutooký ( <i>Megadyptes antipodes</i> )	12	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008
Tučňák kroužkový ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	6	Roeder <i>et al.</i> , 2001
Tučňák uzdičkový ( <i>Pygoscelis antarctica</i> )	16	Kang <i>et al.</i> , 2015
Tučňák brýlový ( <i>Spheniscus demersus</i> )	8	Labuschagne <i>et al.</i> , 2013
	1	Akst <i>et al.</i> , 2002



**Tabulka č. 1:** Pokračování.

Druh tučňáka	Počet mikrosatelitů	Literární zdroj
Tučňák Humboldtův ( <i>Spheniscus humboldti</i> )	6	Schlosser <i>et al.</i> , 2002
	6	Schlosser <i>et al.</i> , 2008
	1	Akst <i>et al.</i> , 2002
Tučňák galapážský ( <i>Spheniscus mendiculus</i> )	3	
Tučňák magellanský ( <i>Spheniscus magellanicus</i> )	1	

### 3.2.1.1 Tučňák kroužkový

Roeder *et al.* (2001) objevili u tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*) šest mikrosatelitů. Vzorky krve byly odebrány 442 jedincům ze 13 hnízdišť. Celková genomická DNA byla extrahována pomocí chloroformové metody nebo kitu Progenome II (Progen Industries). Genomická DNA byla rozštěpena enzymem *Sau3A* a využita k sestavení dvou genomických knihoven. V první knihovně byly fragmenty DNA dlouhé 250-900 bp ligovány do plazmidu pUC18. Tyto plazmidy byly transformovány do DH5 $\alpha$  kompetentních bakterií *Escherichia coli* a pěstovány na agarové plotně obsahující ampicilin, po té byly přeneseny na nylonové hybridizační membrány za účelem selekce inzertů obsahujících určité repetice. U bakterií, které byly úspěšně transformovány a selektovány, autoři purifikovali DNA a insert sekvencovali. Primery byly navrženy pomocí programu PRIMER 3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Autoři konstruovali druhou knihovnu, kde byly fragmenty DNA (300-600 bp) štěpené enzymem *Sau3A* ligovány do SAULA / SAULB linkerů. PCR provedli s párem primerů SAULA. DNA fragmenty byly denaturovány a inkubovány na nylonové membráně. Po té následovala další PCR. Fragmenty byly ligovány do plazmidu pUC18 a vloženy do bakterie. Rekombinantní kolonie byly kultivovány na LB mediu s ampicilinem. Kultury byly poté přeneseny na nylonovou membránu a hybridizovány s radioaktivně

značenou sondou CA. Autoři sekvencovali inserty z bakterií, které obsahovaly CA repetice (Sambrook *et al.*, 1989).

Autoři objevili šest mikrosatelitů (TP500, AM12, AM13, AM3, RM3, RM6). Sedmý lokus (HrU2), který autoři použili, byl izolován od vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*; Ellegren, 1992; Primmer *et al.*, 1996) z řádu pěvci. Teploty *annealingu* u PCR byly 54 °C (u lokusů AM3, AM12, AM13 a RM3), 57°C (RM6) a 58 °C (TP500). Na lokusech autoři popsali 4 (AM3) – 20 (AM13) alel u 39 jedinců.

### 3.2.1.2 Tučňák galapážský a tučňák magellanský

Akst *et al.* (2002) srovnávali mikrosatelity u čtyř druhů rodu *Spheniscus* – tučňáků brýlových (*S. demersus*) a tučňáků Humboldtových (*S. humboldti*) a porovnali jejich variabilitu u tučňáka galapážského (*S. mendiculus*) a magellanského (*S. magellanicus*).

Krev z tučňáků autoři odebrali punkcí a uložili ji do lyzačního puftru. DNA extrahovali pomocí kitu DNeasy Tissue (Qiagen). Pro tuto studii byly použity lokusy s jednotkou repetice šest nukleotidů. Primery byly značeny fluorescenčně nebo byly do reakce přidány fluorescenčně značené dNTP. Produkty s těmito konci byly purifikovány Sephadexem.

Teploty *annealingu* v PCR reakci byly 50 °C (B3-2, G2-2 a H2-6), 53 °C (M1-11), 54 °C (G3-6) a 55 °C (G3-11). Mikrosatelity byly analyzovány v programu GENEPOP 1.3 (Raymond *et Rousset*, 1995).

Autoři testovali lokusy u 46 jedinců každého druhu. Pět z lokusů bylo polymorfních nejméně u jednoho druhu. V populaci tučňáka magellanského byly čtyři lokusy (B3-2, G2-2, G3-11 a H2-6) polymorfní. Tyto mikrosatelity byly v Hardy-Weinbergově rovnováze. Byly více heterozygotní než u tučňáků galapážských ( $P < 0,05$ ). Mikrosatelit G3-6 byl mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu a lokus G2-2 byl v Hardy-Weinbergově rovnováze po Bonferroniho korekci. Maximální počet alel u tučňáka magellanského byl 19 (lokus G3-6). U tučňáka galapážského byly tři lokusy polymorfní (G3-11, G3-6, H2-6), z nichž dva (G3-11, H2-6) byly v Hardy-Weinbergově rovnováze. Oba tyto lokusy měly 3 alely (což byl u tohoto druhu tučňáka maximální počet).

### 3.2.1.3 Tučňák Humboldtův

Schlosser *et al.* (2003) objevili u tučňáka Humboldtova (*Spheniscus humboldti*) sedm polymorfních mikrosatelitů (Sh1Ca9, Sh1Ca12, Sh1Ca16, Sh1Ca17, Sh2Ca12, Sh2Ca21 a Sh2Ca22). Polymorfizmus u tučňáka Humboldtova zhodnotili autoři na vzorkách DNA odebraných 24 tučňákům ze čtyř hnízdících kolonií. Extrahovaná DNA byla štěpena *Tsp590I*, byly izolovány fragmenty dlouhé 500-1000 bp. Produkty polymerázové řetězové reakce (PCR) byly hybridizovány na biotinylované (CA)<sub>n</sub> repetice. Autoři zaklonovali fragmenty do bakterií a následně sekvencovali. K navržení primerů použili software PRIMER 3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Teploty *annealingu* byly 53, 56, 58 a 60 °C. Všechny lokusy byly v Hardy-Weinbergově rovnováze až na jeden (Sh2Ca22). Mikrosatelity měly 5-11 (lokus Sh1Ca12) alel. Počet alel u konkrétních druhů autoři neuvádějí.

Mikrosatelity byly testovány na dalších osmi druzích tučňáků (viz tabulka č. 2):

- 20 jedinců – tučňák brýlový a magellanský;
- pět jedinců – tučňák nejmenší, oslí, patagonský, skalní a žlutorohý;
- dva jedinci – tučňák uzdičkový.

**Tabulka č. 2:** *Cross-species* PCR amplifikace s primery objevenými pro tučňáka Humboldtova na dalších druzích tučňáků (Schlosser *et al.*, 2003).

Lokus	Tučňák							
	brýlo- vý	mage- llanský	nej- menší	oslí	pata- gonský	skal- ní	uzdič- kový	žluto- rohý
Sh1Ca9	P	P	P	P	P	P	M	P
Sh1Ca12	P	P	P	P	P	P	M	M
Sh1Ca16	P	P	P	P	P	P	M	P
Sh1Ca17	P	P	P	P	M	P	M	M
Sh2Ca12	P	P	P	P	M	P	X	P
Sh2Ca21	P	P	P	P	P	P	M	P
Sh2Ca22	P	P	P	P	P	P	P	P

Legenda:

P – mikrosatelit se povedlo amplifikovat, produkt byl polymorfní,

M – mikrosatelit se povedlo amplifikovat, ale produkt byl monomorfní,

X – mikrosatelit se nepovedlo amplifikovat.

Schlosser *et al.* (2008) izolovali od tučňáka Humboldtova dalších pět mikrosatelitů. Tyto mikrosatelity byly objeveny podle protokolů Schlosser *et al.* (2003) a Garner *et al.* (2000). Autoři provedli screening 28 mikrosatelitů a objevili 5 nových polymorfních lokusů (Sh2Ca31, Sh2Ca40, Sh2Ca49, Sh2Ca55 a Sh2Ca58). Těchto pět nově objevených mikrosatelitů mělo 4-16 alel. PCR amplifikace a genotypizace byla provedena podle Schlosser *et al.* (2003). Teploty *annealingu* byly 64 °C (Sh2Ca31), u zbývajících mikrosatelitů 63 °C. Autoři odhalili možné nulové alely u lokusů Sh1Ca12, Sh2Ca22 a Sh2Ca55.

#### **3.2.1.4 Tučňák žlutooký**

Boessenkool *et al.* (2008) objevili u tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*) 12 mikrosatelitů. Autoři sestavili dvě genomové knihovny. Genomická DNA byla izolována použitím DNeasy Kit (Qiagen). DNA fragmenty autoři amplifikovali, po té použili biotinylované (GT)<sub>12</sub> a (GA)<sub>12</sub> próby. Úseky DNA, které obsahovaly mikrosatelity, autoři izolovali pomocí magnetických částic značených streptavidinem a štěpili restrikcí enzymem *MboI* (Promega). Štěpená DNA byla ligována do pUC19 klonovacího vektoru.

Autoři objevili málo pozitivních klonů, které obsahovaly repetice delší než osm párů bází, proto konstruovali knihovnu třetí (podle Glenn *et Schable*, 2005). DNA štěpili enzymem *RsaI* a vložili ji do SuperSNX linkeru. Biotinylované (GA)<sub>12</sub>, (GT)<sub>12</sub>, (AAC)<sub>6</sub>, (AAG)<sub>8</sub>, (ACT)<sub>12</sub> a (ATC)<sub>8</sub> sondy hybridizovali na linker-ligované DNA a mikrosatelity byly izolovány za použití magnetických částic značených streptavidinem. Z první a druhé knihovny autoři navrhli 38 párů primerů, dalších 20 párů navrhli ze třetí knihovny.

Autoři testovali mikrosatelity u 43 jedinců. Lokusy obsahovaly 2-8 (Man51) alel, všechny byly v Hardy-Weinbergově rovnováze až na lokus Man47.

#### **3.2.1.5 Tučňák žlutorohý**

Ahmed *et al.* (2009) popsali 25 mikrosatelitů u tučňáka žlutorohého (*Eudyptes chrysolophus*). Autoři extrahovali genomickou DNA. Genomová knihovna byla

obohacena o mikrosatelitové di- a tetranukleotidové motivy: (GT)<sub>n</sub>, (CT)<sub>n</sub>, (GTAA)<sub>n</sub>, (CTAA)<sub>n</sub>, (TTTC)<sub>n</sub> a (GATA)<sub>n</sub>.

Autoři sekvencovali inzerty z 288 transformovaných kolonií. 132 sekvencí obsahovalo mikrosatelitové motivy. Autoři našli 47 sekvencí, z nichž každá obsahovala minimálně osm repetic. Primery byly navrženy pro 32 sekvencí pomocí softwaru PRIMER 3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Autoři našli 25 polymorfních mikrosatelitů. Na lokusu Ech020 bylo devět alel. Šest lokusů (Ech005, Ech012, Ech063, Ech091, Ech113 a Ech130) se výrazně odchylovalo od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Další čtyři lokusy (Ech003, Ech024, Ech050 a Ech051) vykazovaly výrazné odchylky nebo se tyto lokusy nepovedlo amplifikovat. Autoři vybrali 17 polymorfních mikrosatelitů, u kterých nebyl prokázán významný odklon od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. U 13 lokusů spočítali autoři průměrnou pozorovanou a očekávanou heterozygotnost, která byla 0,64 a 0,76. Lokusy byly testovány u nejméně sedmi jedinců (některé mikrosatelity byly testovány až u 28 jedinců). Polymorfní lokusy měly až 33 alel (Ech005).

Všech 25 lokusů bylo testováno u dalších druhů tučňáků. Každý lokus byl testován u tří jedinců. Autoři zjistili genotypy u tučňáka kroužkového, oslího, patagonského a uzdičkového. Osm lokusů (Ech008, Ech012, Ech030, Ech051, Ech060, Ech071, Ech081 a Ech091) bylo polymorfních u nejméně tří ze čtyř testovaných druhů. Počet alel je uveden u každého lokusu – viz tabulka č. 3.

**Tabulka č. 3:** *Cross species* PCR amplifikace s primery objevenými pro tučňáka žltorohého na dalších druzích tučňáků. (Ahmed *et al.*, 2009).

Lokus	Tučňák			
	kroužkový	oslí	patagonský	uzdičkový
Ech003	M	M	M	M
Ech005	P (3)	P (4)	P (5)	P (2)
Ech007	P (3)	M	M	M
Ech008	P (2)	M	P (2)	P (2)
Ech009	P (4)	M	M	P (2)
Ech010	P (2)	M	M	P (2)
Ech011	P (2)	M	P (5)	M
Ech012	P (4)	P (6)	X	P (6)

**Tabulka č. 3:** Pokračování.

Lokus	Tučňák			
	kroužkový	oslí	patagonský	uzdičkový
Ech014	X	X	X	X
Ech020	P (2)	P (4)	P (3)	P (3)
Ech024	P (3)	M	M	X
Ech029	M	M	M	M
Ech030	M	P (5)	P (3)	P (5)
Ech036	M	M	P (3)	M
Ech039	P (5)	P (3)	P (4)	M
Ech050	M	M	M	M
Ech051	M	P (2)	P (4)	P (3)
Ech060	P (2)	P (2)	P (2)	M
Ech063	M	P (2)	P (4)	M
Ech065	P (3)	M	M	M
Ech071	P (4)	P (3)	P (4)	P (4)
Ech081	P (2)	P (3)	P (3)	P (2)
Ech091	P (2)	P (2)	M	P (2)
Ech113	X	X	X	X
Ech130	-	M	P (2)	M

Legenda:

( ) – počet alel daného lokusu

P – mikrosatelit se povedlo amplifikovat, produkt byl polymorfní,

M – mikrosatelit se povedlo amplifikovat, ale produkt byl monomorfní,

X – mikrosatelit se nepovedlo amplifikovat,

- – mikrosatelit nebyl testován.

### 3.2.1.6 Tučňák nejmenší

Tučňák nejmenší (*Eudyptula minor*) je považován za jediný druh, autoři Banks *et al.* (2002) však objevili dvě velice odlišné mitochondriální linie – jednu na Novém Zélandu a druhou v Austrálii. Grosser *et al.* (2014) objevili u tučňáka nejmenšího 20 mikrosatelitů. Genomovou DNA u tučňáka nejmenšího z Austrálie extrahovali pomocí fenolchloroformové metody a shotgun sekvencování provedli na Novém

Zélandu. Autoři přečetli sekvence pro di-, tri- a tetranukleotidové mikrosatelity obsahující nejméně pět opakujících se jednotek a vytvořili pro ně primery. Autoři vybrali a naamplifikovali 30 lokusů. Deset párů primerů neamplifikovalo DNA nebo byly jejich produkty monomorfní. Zbylých 20 párů primerů bylo zkombinováno do sedmi multiplex PCR.

Grosser *et al.* (2014) testovali u mikrosatelitů vazebnou nerovnováhu a odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Vazebná nerovnováha byla pozorována u čtyř párů mikrosatelitů (Em9 a Em2, Em8 a Em2, Em5 a Em24, Em9 a Em13), tato nerovnováha nebyla přítomna u všech populací, a tak autoři z dalších analýz nevyloučili žádné lokusy. Em15 vykazuje odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy ve všech populacích na Novém Zélandu ne však v Austrálii. Em2, Em6 a Em28 prokázaly odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy pouze v jedné populaci na Novém Zélandu i Austrálii. Tato neshoda je možná způsobena nulovými alelami. Počet alel u tučňáka nejmenšího byl v rozmezí od 2 do 26 (průměr 9,15 pro tučňáky z Austrálie a 9,35 pro tučňáky z Nového Zélandu).

Billings *et al.* (2007) izolovali u tučňáka nejmenšího osm mikrosatelitů. Extrahovali DNA pomocí vysolovací metody z krevního vzorku tučňáků. Knihovna s genomickou DNA byla obohacena o  $(GA)_n$  a  $(GAAA)_n$  repetice. Fragmenty byly separovány elektroforézou v agarózovém gelu.

Autoři purifikovali fragmenty o velikosti 400-900 bp, hybridizovali denaturované DNA fragmenty, které byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), užitím primerů a klonovány do pGEM vektoru (Promega). Pozitivní klony byly amplifikovány PCR reakcí a produkty byly purifikovány užitím purifikačního kitu QIAquick (Qiagen) a komerčně sekvencovány.

Ze 192 klonů v genomické knihovně obohacené o dinukleotidy  $(GA)_n$  bylo 18 klonů obsahujících repetice. Primery byly navrženy pro devět z těchto fragmentů DNA, které obsahovaly sedm nebo více opakování. Ze 179 klonů v genomové knihovně obohacené o  $(GAAA)_n$  sekvenci, bylo nalezeno 10 klonů, které obsahovaly repetice. Primery byly navrženy pro jeden klon, který obsahoval 15 repetic a vhodnou sekvenci pro nasednutí primerů. Autoři hodnotili polymorfismus na nejméně 21 pravděpodobně nepříbuzných jedincích z Filipova ostrova a nejméně pět jedincích z populace z Troubridgeova ostrova (jižní Austrálie).

Sedm lokusů bylo polymorfních, pro tučňáky z Filipova ostrova, ačkoli dva mikrosatelity (Emm6 a Emm8) vykazovaly nízkou variabilitu. Locus Emm8 byl

monomorfní u populace tučňáků z Troubridgeova ostrova, ale polymorfní (tři alely) u populace tučňáků z Filipova ostrova. Emm4 lokus byl monomorfní u tučňáků z Filipova ostrova, ale polymorfní u tučňáků z Troubridgeova ostrova (tři alely). Dva lokusy (Emm2 a Emm8) byly mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu. U populace tučňáků žijících na Filipově ostrově bylo nejvíce alel na lokusu Emm2 – 14 alel. U tučňáků z Troubridgeova ostrova byl maximální počet alel osm u dvou lokusů – Emm2 a Emm5.

### 3.2.1.7 Tučňák uzdičkový

Kang *et al.* (2015) izolovali z tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*) 16 mikrosatelitů. Krevní vzorky byly odebrány od sedmi jedinců. DNA byla izolována pomocí DNeasy blood a tissue kit (Qiagen). Primery byly navrženy pomocí softwaru PRIMER 3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000).  $T_a$  v PCR byla 65 °C (sedm cyklů), 61 °C (sedm cyklů), 58 °C (sedm cyklů) a 55 °C (21 cyklů).

Z 30 mikrosatelitů bylo amplifikováno 29, 16 z nich bylo polymorfních. Dva lokusy (Pygantarc11 a Pygantarc18) byly mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu. *Cross-species* PCR amplifikace byla provedena i u dalších druhů: tučňáka oslího, kroužkového a žlutorohého. Od každého druhu byli testováni dva jedinci. U tučňáka oslího se amplifikace podařila u všech mikrosatelitů až na dva (Pygantarc27 a Pygantarc29). U tučňáka kroužkového se nepovedlo amplifikovat jeden lokus (Pygantarc27) a nedošlo k amplifikaci pěti lokusů (Pygantarc03, Pygantarc11, Pygantarc15, Pygantarc18 a Pygantarc27). Lokusy měly 2-9 alel. Nejvíce alel měl lokus Pygantarc16.

### 3.2.2 Polymorfní EST mikrosatelity

Dawson *et al.* (2010) objevili nové mikrosatelity, které jsou velice úspěšné u mnoha druhů ptáků. Autoři popsali jednoduchou metodu k izolaci mikrosatelitů a ukázali úspěšnost této metody u ptactva. Identifikovali 35 konzervovaných EST („Expressed Sequence Tag“) mikrosatelitů od zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a přiřadili k nim jejich homology od kura domácího (*Gallus gallus*). Tyto dva druhy ptáků jsou geneticky velmi vzdálené, mají nejrozdílnější teplotu DNA:DNA hybridizace. Autoři se rozhodli použít EST mikrosatelity zebřičky pestré ze dvou důvodů:



- EST sekvence (kódující sekvence), jsou konzervovanější a mají vyšší homologii s genomem kura domácího než běžné sekvence
- již bylo objeveno mnoho EST mikrosatelitů

Některé ze selektovaných ptačích EST mikrosatelitů měly poměrně malý počet nepřerušovaných dinukleotidových repetic (průměrná délka byla 7,4 repetic, rozsah 3-15), průměrně měly polymorfni mikrosatelity devět repetic. Autoři vytvořili primery pro mikrosatelity, které měly minimálně tři nepřerušované repetice. Neobjevili klesající úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace s rostoucí genetickou vzdáleností mezi druhy.

Homologní sekvence kura domácího byly identifikovány pomocí WU-BLAST a NCBI BLAST. Lokusy jsou pojmenovány TG – podle prvních písmen latinských jmen obou druhů – zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura domácího (*Gallus gallus*).

Sady primerů byly použity pro genotypizaci jedinců 52 druhů z 15 různých ptačích řádů. Do testovaných druhů bylo zahrnuto 22 čeledí z řádu pěvci a 30 čeledí z ostatních skupin ptáků různě příbuzných. Z 687 zkoumaných ptačích EST mikrosatelitových sekvencí zebřičky pestré, 465 (68 %) mikrosatelitů vykazovalo homologii s mikrosatelity kura domácího.

U 33 ptačích EST mikrosatelitů, bylo průměrně 100 % lokusů amplifikováno u 17 čeledí pěvců a průměrně 99 % u pěti čeledí mimo řád pěvci. Podíl polymorfních lokusů se pohybuje mezi 24-76 % (průměr 48 %) u pěvců a 18-26 % (průměr 21 %) u ostatních skupin ptáků. Žádný lokus nevykazoval odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Tyto nové mikrosatelitové markery mají nejvyšší mezidruhovou úspěšnost ze všech dosud objevených markerů. Mají široké spektrum využití – jsou vhodné například pro *cross-species* PCR amplifikaci, testování otcovství a populační studie.

Pouze lokus TG09-014 byl u všech zkoumaných druhů monomorfni. Podíl polymorfních lokusů na druh, kdy byli testováni čtyři jedinci, se pohybuje mezi 24-76 % u pěvců a 18-26 % u ostatních skupin ptáků. Polymorfizmus klesal u pěvců s rostoucí genetickou vzdáleností od zebřičky. Lokusy TG01-040, TG02-088, TG04-012, TG11-011 a TG12-015 byly polymorfni u 13-16 ze 17 čeledí pěvců.

Všechny lokusy byly amplifikovány a devět (26%) lokusů bylo polymorfních u zástupců řádu dlouhokřídlí. Lokusy u zebřičky pestré měly 2-6 alel, u kura domácího 2-5 alel.

### 3.2.3 Konzervované ptačí mikrosatelity

Dawson *et al.* (2013) našli vysoce konzervované sekvence v genomu kura domácího (*Gallus gallus*) a zebříčky pestré (*Taeniopygia guttata*).

Autoři odebrali z každého jedince 20-50 µl krve a uložili je do zkumavky s 1,5 ml absolutního ethanolu. Genomická DNA byla extrahována precipitací v prostředí octanu amonného nebo vysolovací extrakcí.

Našli kontigy a superkontigy v té době nekompletního genomu zebříčky a kompletního genomu kura verze 2.1 (Hillier *et al.*, 2004). Identifikovali sekvence obsahující dinukleotidové repetice (CA, GA, AT, GC a jejich komplemetry). Dále extrahovali sekvence dlouhé 200 bp, které obsahovaly oblasti pro nasedání primerů, nebo vhodné sekvence, které byly kratší než 200 bp.

Autoři extrahovali sekvence zebříčky a porovnali je pomocí BLAST se sekvencemi kura, které byly 421-487 bp dlouhé. Primery navrhli pomocí software PRIMER 3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Teplota *annealingu* u primerů byla mezi 57-63 °C, mezi forward a reverse primerem byl rozdíl teplot maximálně 1,0 °C. Forward primer každého páru primeru byl značen HEX nebo 6-FAM fluorescentním koncem.

Pokud to bylo nezbytné, zahrnují do primeru degenerovanou bázi – použili maximálně dvě degenerované báze na primer nebo tři degenerované báze na pár primerů. 18 párů primerů obsahovalo degenerované báze. Primery byly navrženy u homologních sekvencí, které obsahovaly nejméně osm repetic u obou druhů, byly navrženy podle sekvence zebříčky a byly nejméně v 86 % stejné se sekvencemi s genomem kura (sekvence, které stejné nebyly, byly nahrazeny degenerovanými bázemi). Testovali mikrosatelity u osmi druhů řádu pěvci a čtyř skupin ptáků mimo řád pěvci. Většinu nových konzervovaných ptačích mikrosatelitů = CAM („Conserved Avian Microsatellite“) autoři úspěšně amplifikovali ve všech 12 testovaných druzích (průměrně v 96 % pěvců a v 94 % ostatních skupin ptáků). CAM primery jsou vysoce použitelné ve skupině pěvců (68 % lokusů bylo polymorfních), u skupin ostatních ptáků bylo polymorfních 42 % lokusů. Když posuzovali všech 24 CAM markerů jako celek, podíl polymorfních lokusů na druh negativně souvisel s genetickou vzdáleností od zebříčky. Polymorní mikrosatelity obsahovaly 2-11 alel.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologická materiál, se kterým jsem v rámci bakalářské práce pracovala, poskytla Ornitologická stanice v Přerově (ORNIS). Svalstvo bylo odebráno od šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) pocházejících z rybníků střední Moravy.

Vedoucí práce izoloval genomickou DNA pomocí fenol-chloroformové metody a rozpustil ji v TE pufru. DNA naředil na koncentraci 10 µg/ml.

### 4.2 Polymorfní mikrosatelity testované u potápky roháče

Pomocí *cross-species* PCR amplifikace na šesti nepříbuzných jedincích potápky roháče jsem testovala polymorfismus 171 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů. Jednalo se o všechny známé mikrosatelity od druhů z řádu tučňáci, ptačí EST mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity.

Z řádu tučňáci devět autorů objevilo celkem 113 mikrosatelitů od osmi druhů, které jsou popsány v deseti článcích. Tyto informace jsou uvedeny v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4:** Přehled mikrosatelitových lokusů pocházejících od ptáků řádu tučňáci testovaných na polymorfismus u potápky roháče. V tabulce je uveden zdrojový druh, název mikrosatelitového lokusu a literární zdroj.

Zdrojový druh	Mikrosatelity	Literární zdroj
Tučňák žlutorohý ( <i>Eudypetes chrysolophus</i> )	Ech003, Ech005, Ech007, Ech008, Ech009, Ech010, Ech011, Ech012, Ech014, Ech020, Ech024, Ech029, Ech030, Ech036, Ech039, Ech050, Ech051, Ech060, Ech063, Ech065, Ech071, Ech081, Ech091, Ech113, Ech130	Ahmed <i>et al.</i> , 2009

**Tabulka č. 4:** Pokračování 1.

Zdrojový druh	Mikrosatelity	Literární zdroj
Tučňák nejmenší ( <i>Eudyptula minor</i> )	Emm1, Emm2, Emm3, Emm4, Emm5, Emm6, Emm7, Emm8	Billing <i>et al.</i> , 2007
	Em1, Em2, Em4, Em5, Em6.2, Em8F, Em9, Em12.2, Em13, Em14, Em15, Em21, Em22, Em23, Em24, Em26, Em27, Em28, Em29.2, Em30	Grosser <i>et al.</i> , 2014
Tučňák žlutooký ( <i>Megadyptes antipodes</i> )	Man03, Man08, Man13, Man21, Man22, Man27, Man39, Man47, Man50, Man51, Man54, Man55	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008
Tučňák kroužkový ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	AM3, AM12, AM13, TP500, RM3, RM6	Roeder <i>et al.</i> , 2001
Tučňák uzdičkový ( <i>Pygoscelis antarctica</i> )	Pygantarc02, Pygantarc03, Pygantarc06, Pygantarc07, Pygantarc11, Pygantarc15, Pygantarc16, Pygantarc18, Pygantarc19, Pygantarc22, Pygantarc24, Pygantarc25, Pygantarc26, Pygantarc27, Pygantarc28, Pygantarc29,	Kang <i>et al.</i> , 2015
Tučňák brýlový ( <i>Spheniscus demersus</i> )	PNN01, PNN03, PNN05, PNN06, PNN07, PNN08, PNN09, PNN12	Labuschagne <i>et al.</i> , 2013
	B3-2	Akst <i>et al.</i> , 2002
Tučňák Humboldtův ( <i>Spheniscus humboldti</i> )	H2-6	
	Sh1Ca09, Sh1Ca12, Sh1Ca16, Sh1Ca17, Sh2Ca12, Sh2Ca21, Sh2Ca22	Schlosser <i>et al.</i> , 2002
	Sh2Ca31, Sh2Ca40, Sh2Ca49, Sh2Ca55, Sh2Ca58	Schlosser <i>et al.</i> , 2008

**Tabulka č. 4:** Pokračování 2.

Zdrojový druh	Mikrosatelity	Literární zdroj
Tučňák galapážský ( <i>Spheniscus mendiculus</i> )	G3-11, G3-6, G2-2	Akst <i>et al.</i> , 2002
Tučňák magellanský ( <i>Spheniscus magellanicus</i> )	M1-11	

Dále bylo testováno celkem 34 ptačích EST mikrosatelitů a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů – viz tabulka č. 5.

**Tabulka č. 5:** Přehled ptačích EST mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů testovaných na polymorfismus u potápky roháče. V tabulce je uveden původ mikrosatelitů, název mikrosatelitového lokusu a literární zdroj.

Zdroj	Mikrosatelity	Literární zdroj
Ptačí EST mikrosatelity	TG01-000, TG01-040, TG01-077, TG01-092, TG01-114, TG01-124, TG01-147, TG01-148, TG02-078, TG02-088, TG02-120, TG03-002, TG03-031, TG03-034, TG03-035, TG03-098, TG04-004, TG04-012, TG04-012A, TG04-041, TG04-061, TG05-030, TG05-046, TG05-053, TG06-009, TG07-022, TG08-024(1), TG08-024(2), TG11-011, TG12-015, TG13-009, TG13-016, TG13-017, TG22-001	Dawson <i>et al.</i> , 2010
Konzervované ptačí mikrosatelity	CAM-01, CAM-02, CAM-03, CAM-04, CAM-05, CAM-06, CAM-07, CAM-08, CAM-09, CAM-10, CAM-11, CAM-12, CAM-13, CAM-14, CAM-15, CAM-16, CAM-17, CAM-18, CAM-19, CAM-20, CAM-21, CAM-22, CAM-23, CAM-24	Dawson <i>et al.</i> , 2013

#### 4.2.1 PCR amplifikace

- 1) Do označených mikrozkušavek (1,5ml) jsem napipetovala položky podle tabulky č. 6. Vše jsem zvortexovala a zcentrifugovala.

**Tabulka č. 6:** Objemy položek pro PCR aplikaci šesti vzorků

Položka	Objem [μl]
Deionizovaná voda	44,4
Reaction Buffer A 10x	6,7
Roztok MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (20 μmol/l)	0,7
Primer R (10 μmol/l)	3,3
Primer F (10 μmol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza 5 U/μl	1,0

- 2) Do šesti mikrozkušavek (0,2ml) jsem napipetovala po 1 μl genomické DNA od šesti jedinců potápky roháče a 9 μl PCR reakční směsi. Opět jsem mikrozkušavky zvortexovala a zcentrifugovala. Vložila jsem je do termocykléru. Polymerázová řetězová reakce proběhla podle tabulky č. 7:

**Tabulka č. 7:** Časový a teplotní interval PCR reakce

Krok PCR	Čas	Teplota [°C]	Počet cyklů
Denaturace	5 min	94	35
	30 s	94	
<i>Annealing</i>	30 s	X	
Elongace, syntéza dvoušroubovice DNA	30 s	72	
Prodloužení řetězce	7 min	72	1

Legenda:

X – Nejprve jsem všechny vzorky testovala PCR amplifikací při teplotě *annealingu* 50 °C. Pokud byl mikrosatelit hodnotitelný (byly zřetelně

hodnotitelné alely), dál jsem s ním nepracovala. Pokud nebyl mikrosatelit hodnotitelný, teplotu *annealingu* jsem snižovala nebo zvyšovala.

#### 4.2.2 Elektroforetická separace a vizualizace PCR produktů

Pro elektroforetickou separaci jsem používala 6% polyakrylamidový gel a elektroforetickou komůrku S2 Whatman Biometra. Rozměry skel byly 330 x 390 mm (malé sklo) a 330 x 420 mm (velké sklo). Tloušťka gelu byla 0,4 mm.

- 1) Velké sklo jsem řádně omyla vodou, po té opláchla deionizovanou vodou. Osušila stěrkou a ubrousky a přenesla do digestoře. V digestoři jsem sklo opláchla 96% ethanolem a opět osušila ubrouskem. Ošetřila jsem jej přípravkem pro odpuzování vody (tekuté stěrače – Rain off, schne 5 min).
- 2) Malé sklo jsem omyla saponátem, osušila stěrkou a ubrousky. Přenesla jsem jej do digestoře, kde jsem ho opláchla 96% ethanolem a opět osušila ubrouskem. Po té jsem sklo ošetřila molekulárním lepidlem (schne 5 min).
- 3) Velké sklo jsem opláchla deionizovanou vodou a osušila ubrouskem, položila na kraje skla dva spacersy silné 0,4 mm. Malé sklo jsem opláchla 96% ethanolem a utřela dosucha ubrousky. Malé sklo jsem položila na velké sklo se spacerem a připevnila čtyřmi malými svorkami tak, že gumy spacerů jsem přitiskla k menšímu sklu.
- 4) Připravila jsem si polyakrylamidový gel, nalila ho mezi skla, vložila jsem hřebínek rovnou stranou a ponořila asi 0,5 cm hluboko mezi skla. Hřebínek jsem připevnila čtyřmi velkými svorkami. Gel jsem nechala 50 minut polymerizovat.
- 5) Následně jsem sundala svorky, skla jsem umyla, osušila a vložila do elektroforetické komůrky, hřebínkem nahoru a menším sklem k hliníkové desce.
- 6) Do katodového a anodového prostoru jsem nalila 0,5 x TBE pufr. Vyndala hřebínek a vzniklou mezeru jsem propláchla injekční stříkačkou. Připojila jsem elektrody a na zdroji stejnosměrného napětí nastavila hodnoty 90 W, 3000 V, 150 mA. Gel jsem nechala předehtřívát 30 minut.

- 7) Mezitím jsem si připravila vzorky, které jsem později nanesla do gelu. K PCR produktu jsem přidala 5  $\mu$ l nanášecího pufru. Připravené vzorky jsem vložila na 3 minuty do termobloku (96 °C). Po vytažení jsem přemístila vzorky do ledu (aby nedošlo k renaturaci DNA).
- 8) Vypnula jsem zdroj stejnosměrného proudu a odpojila katodu. Katodový prostor jsem řádně vyčistila pufrům pomocí injekční stříkačky. Mezi skla jsem vložila hřebínek – zoubky směrem do gelu.
- 9) Do jednotlivých jamek hřebínku jsem pomocí 6kanálové pipety nanesla 2,4  $\mu$ l vzorku. Zavřela jsem katodový prostor, zapojila katodu a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastavila hodnoty 70 W, 3000 V, 150 mA.
- 10) Čas separace vzorků závisel na molekulárních hmotnostech PCR produktů. Při mé práci byl tento čas 1,5-3 h.
- 11) Připravila jsem si fix/stop roztok, 1% roztok  $\text{HNO}_3$  a vývojku (kterou jsem dala do ledničky).
- 12) Po uplynutí separace PCR produktu jsem vypnula zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojila elektrody, vypustila pufr. Vyjmula jsem skla, položila je menším sklem nahoru a odpáčila je od sebe nožem.
- 13) Menší sklo s gelem jsem vložila do misky, kterou jsem postavila na třepačku gelem nahoru. Zalila jsem sklo fix/stop roztokem a nechala 20 minut omývat. Roztok jsem slila zpět do baňky.
- 14) Sklo s gelem jsem 3 x promyla v deionizované vodě.
- 15) Zalila jsem ho 1% roztokem kyseliny dusičné, nechala působit 4 minuty a následně 4 x promyla v deionizované vodě.
- 16) Nyní jsem ho vložila do 1% roztoku dusičnanu stříbrného, do kterého jsem těsně před zalitím přidala 1,2 ml formaldehydu. Roztok jsem nechala působit 30 minut.
- 17) Připravila jsem si misku s deionizovanou vodou, ve které jsem provedla 10s oplach skla.
- 18) Sklo s gelem jsem ponořila do vývojky, do které jsem těsně před použitím přidala 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu$ l 1% roztoku thiosíranu sodného.



19) Gel na skle začal tmavnout, začaly se objevovat hnědočerné bandy PCR produktů obarvené stříbrem. Po dostatečném obarvení proužků jsem do misky přilila fix/stop roztok a další obarvování takto zastavila. Po skončení tvorby CO<sub>2</sub> bublin jsem sklo s gelem opláchla v deionizované vodě a vložila do sušárny.

20) S vedoucím práce jsme vyhodnotili vysušené sklo s gelem na negatoskopu.

### 4.3 Použité chemikálie

- 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 (Sigma)
- ethanol – 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- ethylendiaminotetraoctan sodný (Na<sub>2</sub>EDTA) (Lachema)
- ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)
- formaldehyd (Lachema)
- formamid (Lachema)
- hydroxid sodný (Lachema)
- chlorid sodný (Lachema)
- kyselina boritá (Lachema)
- kyselina chlorovodíková – 35% roztok (Lachema)
- kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)
- kyselina octová – ledová (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- močovina (Lachema)
- N, N'-methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- peroxodisíran amonný (Serva)
- přípravek pro odpuzování vody (tekuté stěrače) – Rain off (Sheran)
- thiosíran sodný (Lachema)

- trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- uhličitan sodný (Lachema)
- xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

#### 4.4 Použité roztoky

##### **akrylamid – 6% zásobní roztok**

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

##### **dusičnan stříbrný – 0,1% roztok**

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

##### **fix/stop roztok**

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

##### **kyselina dusičná – 1% roztok**

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

##### **molekulární lepidlo**

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

##### **nanášecí pufr**

- 0,125 g bromfenolové modře
- 0,125 g xylenové modře

- 25 ml deionizované vody
- 100 ml formamidu

#### **hydroxid sodný – 1 mol/l roztok**

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

#### **peroxodisíran amonný – 10% roztok**

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

#### **polyakrylamidový gel – 6% roztok**

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

#### **TBE pufr – 10x zásobní roztok**

- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 55 g kyseliny borité  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- 40 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

#### **vývojka**

- 800 ml deionizované vody
- 24 g uhličitanu sodného  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- uchovávat v ledničce (méně než 10 °C)
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu$ l 1% roztoku thiosíranu sodného  $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$

## **4.5 Laboratorní přístroje**

- elektroforetický zdroj EV232 (Consort)

- chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- mikropipety Finnpiquette – 0,5 až 10  $\mu$ l (osmikanálová) a 0,3  $\mu$ l až 1 ml (ThermoLabsystems)
- mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu$ l až 1 ml (Nichiryo)
- minicentrifuga CLE CSQSP (Cleaver Scientific Ltd)
- negatoskop NEGA1 (Maneko)
- spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- sekvenční elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- sušárna CAT 8050 (Contherm)
- temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)
- termocyklér GenePro (BIOER Technology)
- termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- vortex MS2 (Ika)
- výrobce deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- výrobce ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

## 5 Výsledky

Mým úkolem v bakalářské práci bylo hledání polymorfních mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců druhu potápky roháče (*Podiceps cristatus*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace. Testovala jsem doposud popsané mikrosatelitní lokusy od zástupců z řádu tučňáci, ptačí EST mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity. Celkem jsem testovala 171 párů primerů. 113 párů primerů bylo z řádu tučňáci (viz tabulka č. 8), od devíti druhů – konkrétně: tučňák žltorohý (*Eudyptes chrysolophus*) – 25 párů primerů, tučňák nejmenší (*Eudyptula minor*) – 28 párů primerů, tučňák žlutooký (*Megadyptes antipodes*) – 12 párů primerů, tučňák kroužkový (*Pygoscelis adeliae*) – šest párů primerů, tučňák uzdičkový (*Pygoscelis antarctica*) – 16 párů primerů, tučňák brýlový (*Spheniscus demersus*) – devět párů primerů, tučňák Humboldtův (*Spheniscus humboldti*) – 13 párů primerů, tučňák magellanský (*Spheniscus magellanicus*) – jeden pár primerů, tučňák galapážský (*Spheniscus mendiculus*) – tři páry primerů; 34 párů primerů ptačích EST mikrosatelitů (viz tabulka č. 9) a 24 párů primerů konzervovaných ptačích mikrosatelitů (viz tabulka č. 10) odvozených od zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura domácího (*Gallus gallus*).

Nejprve jsem všechny mikrosatelity testovala metodou PCR při teplotě *annealingu* 50 °C. Pokud se objevil slabý produkt, teplotu *annealingu* jsem snižovala až na 44 °C. Pokud se objevil produkt silný, a nebylo možné určit počet alel, teplota *annealingu* se zvyšovala – v mém případě až na 68 °C. Také jsem upravovala koncentraci hořčnatých iontů v PCR mixu. Pokud se objevily silné bandy, pracovala jsem s polovičním objemem (koncentrací) hořčnatých iontů (původní koncentrace: 1,6 nmol/l, nová koncentrace: 0,8 nmol/l). Nejdříve jsem provedla 90minutovou elektroforetickou separaci u všech párů primerů. Pokud nebylo možné vyhodnotit genotypy, délka elektroforetické separace se prodloužila až na 180 minut.

Celkem jsme našla 151 monomorfních lokusů. 19 lokusů bylo polymorfních a lokus TG13-016 nevykazoval žádný produkt. Polymorfní lokusy a jejich charakteristika jsou uvedeny v tabulce č. 8, tabulce č. 9 a v tabulce č. 10.

**Tabulka č. 8:** Přehled šesti polymorfních mikrosatelitů pocházejících od dvou druhů řádu tučňáci nalezených při testování polymorfizmu u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. V tabulce je uveden lokus, kód v databázi GeneBank (Accession number), druh, sekvence primerů, jednotka repeticity, teplota *annealingu*, čas elektroforetické separace a počet alel.

Lokus Acc. no.	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repeticity	T <sub>a</sub> [°C]	Čas separace [min]	Počet alel
Ech005 FM878336	Tučňák žltorohý ( <i>Eudyptes chrysolophus</i> )	F: GCCTTATGCAGGTACAGATGTCTTCTC R: TGCTGAAGGTAAAGAGCAGTGAAATC	CTTTT	44	120	6
Ech009 FM878340		F: CCTCTGTTGTACAAGCTGGATGC R: GCAATTCTGCTTGCCTCTGC	AC	68	180	2
Em1 KM272221	Tučňák nejmenší ( <i>Eudyptula minor</i> )	F: TCCAGCTGAGTTGTATGACTTC R: CCCTGTGAGTATAGAGCCTGG	ATCT	53	90	2
Em14 KM272230		F: CAGGAGTGAACCCAAAGCTG R: AGGTACCGAGGGAAGCAAAG	CAA	65	150	3
Em21 KM272232		F: CCACATTCATCCACAGGCAG R: CCTCGCAGGGAATATTTGGC	CT	57	90	2
Emm5 DQ837733		F: ATTA ACTTGGCCTTGGGTTC R: TTTATGCTCCCTCATTCCAC	CTTT	53	90	2

**Tabulka č. 9:** Přehled pěti polymorfních konzervovaných ptačích mikrosatelitů testovaných u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče pocházejících od zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura domácího (*Gallus gallus*) (Dawson *et al.*, 2013). V tabulce je uveden lokus, sekvence primerů, jednotka repetice, teplota *annealingu*, čas elektroforetické separace a počet alel.

Lokus	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	T <sub>a</sub> [°C]	Čas separace [min]	Počet alel
CAM-11	F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGRGAGCGGATG	GT	58	90	5
CAM-17	F: CGGGTTGTAATCAAGAAGATGC R: CTGCGGAGCAATTAACGC	TG	62	90	2
CAM-19	F: TCTTGGAGGCAGATARGAAGTG R: GAGCAAGCAAAGATCACAAGC	GT	64	90	4
CAM-23	F: CTCCACTTAGCTTGTAATGCAC R: CCAAGRAGTGCCCTAGATGTC	TG	60	90	6
CAM-24	F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	CA	54	90	4

**Tabulka č. 10:** Přehled sedmi polymorfních ptačích EST mikrosatelitů u potápky roháče pocházejících od zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura domácího (*Gallus gallus*) (Dawson *et al.*, 2010). V tabulce je uveden lokus, kód v databázi GeneBank (Accession number), sekvence primerů, jednotka repetice, teplota *annealingu*, čas elektroforetické separace a počet alel.

Lokus Acc. no.	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	T <sub>a</sub> [°C ]	Čas separace [min]	Počet alel
TG01-040 DV576233	F: TGGCAATGGTGAGAAGTTTG R: AGAATTTGTACAGAGGTAATGCACTG	AT	64	90	2
TG02-120 DV945440	F: TTGGGCAAAGATGATATGAATG R: AGCCAGGTCCAGTTTCTAAGC	AT	63	120	2
*TG03-002 DV575298	F: TCTTGCCTTTTTGGTATGAGTATAG R: TACAAAGCACTGTGGAGCAG	AT	54	90	3
TG03-098 DV573670	F: TTTGCCTTAATTCTTACCTCATTG R: TTGCAACCTCTGTGGAAGC	AG	54	180	2
TG04-012 CK306810	F: TGAATTTAGATCCTCTGTTCTAGTGTC R: TTACATGTTTACGGTATTTCTCTGG	GT	50	120	8



**Tabulka č. 10:** Pokračování.

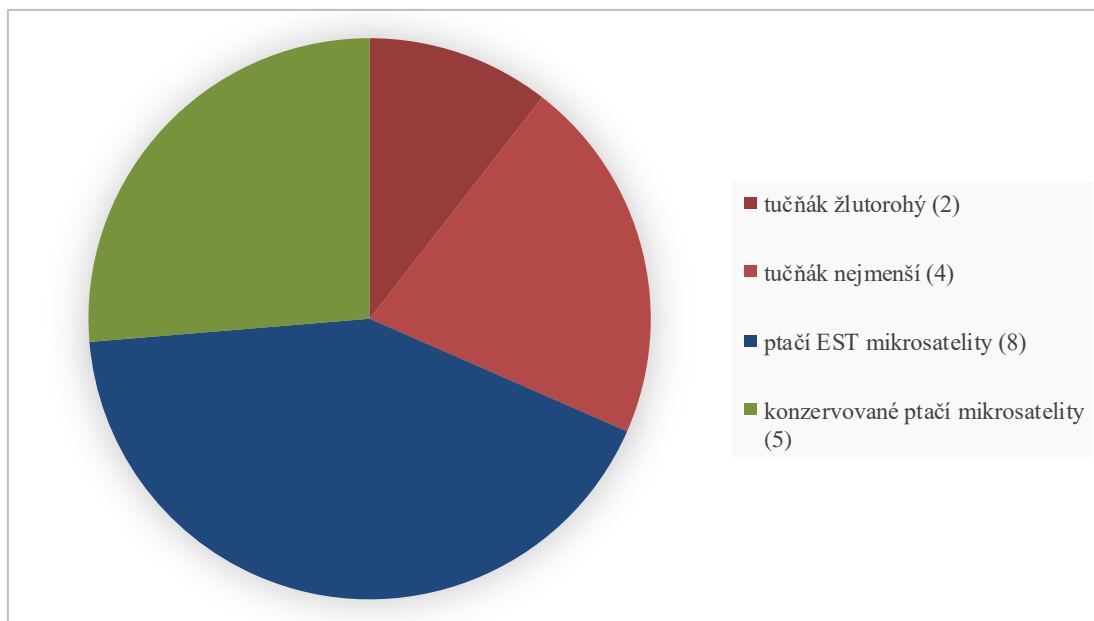
<b>Lokus Acc. no.</b>	<b>Sekvence primerů (5'→3')</b>	<b>Jednotka repetice</b>	<b>T<sub>a</sub> [°C ]</b>	<b>Čas separace [min]</b>	<b>Počet alel</b>
*TG04-061 CK235034	F: GACAATGGCTATGAAATAAATTAGGC R: AGAAGGGCATTGAAGCACAC	A/GA	49	150	5
TG06-009 CK315728	F: AAGCCTTGCTTACATTTTATGGTG R: GGGGTGGTAACTGAAATAAAGTATAGG	AC/GT/ AT	55	90	2

Legenda: \*X – poloviční objem (koncentrace) hořčnatých iontů (0,8 nmol/l) v PCR mixu.

V experimentální části bakalářské práce jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče objevila 19 polymorfních mikrosatelitů z celkového počtu 171 testovaných párů primerů. Celková úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů je tedy 11,1 %. Ze 113 mikrosatelitů od zástupců řádu tučňáci, vykazovalo polymorfní produkt pouze šest mikrosatelitů. Jejich úspěšnost tedy byla 5,3 %. Polymorfní mikrosatelity od jedinců z řádu tučňáci jsem objevila pouze od dvou druhů – tučňáka žltorohého a nejmenšího. Z testovaných 34 ptačích EST mikrosatelitů poskytlo polymorfní produkt osm mikrosatelitů. Jejich úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů byla tedy 23,5 %. Pět polymorfních mikrosatelitů bylo nalezeno z celkových 24 testovaných mikrosatelitů od konzervovaných ptačích mikrosatelitů, úspěšnost tedy byla 20,8 %.

Původ mikrosatelitů, které poskytly polymorfní produkty, jsou zobrazeny v grafu č. 1.

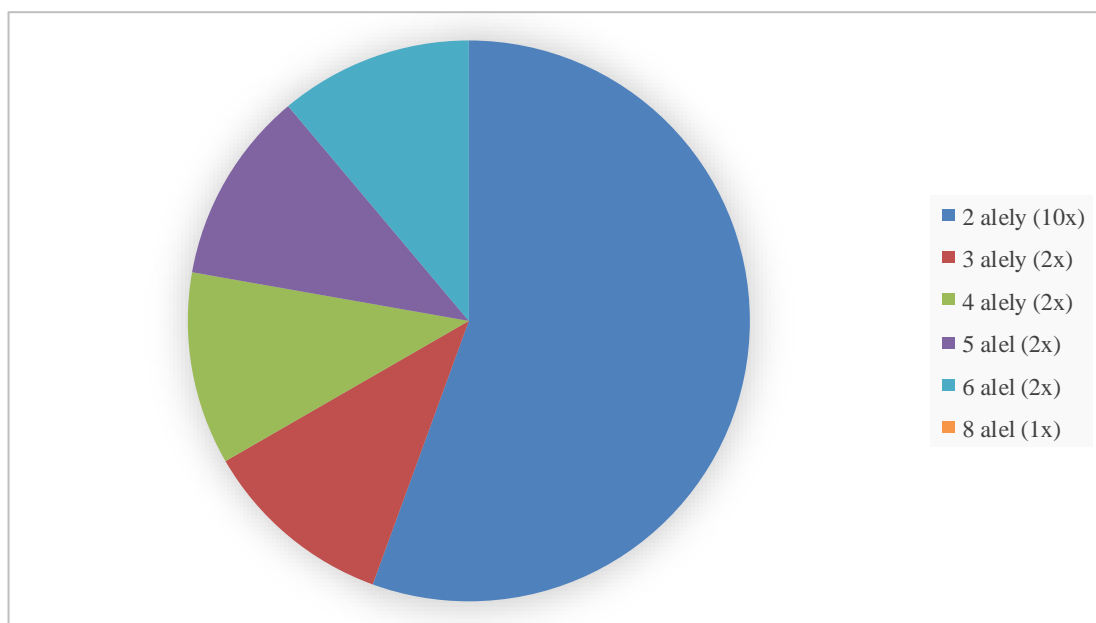
**Graf č. 1:** Polymorfní mikrosatelitové lokusy u potápky roháče rozdělené podle jejich původu. Stupně červené zobrazují polymorfní mikrosatelity u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče od řádu tučňáci, modrá ptačí EST mikrosatelity a zelená konzervované ptačí mikrosatelity. V závorce je uveden počet polymorfních mikrosatelitů u každé skupiny.



Polymorfní mikrosatelitové lokusy obsahovaly 2-8 alel. Nejvíce bylo dvoualelových lokusů – 10. Tři, čtyři, pět a šest alel vykazovaly vždy dva mikrosatelitní

lokusy. Osm alel vykazoval pouze jeden lokus (TG04-012). V případě lokusů, na kterých byly dvě alely, se může jednat i o jiné úseky DNA než mikrosatelity. Toto tvrzení lze odhalit pouze analýzou většího počtu jedinců. Graf č. 2 ukazuje dělení mikrosatelitů podle počtu alel.

**Graf č. 2:** Polymorfních mikrosatelitové lokusy rozdělené podle počtu amplifikovaných alel u potápky roháče. V závorkách jsou uvedeny počty lokusů, které vykazovaly určitý počet alel.



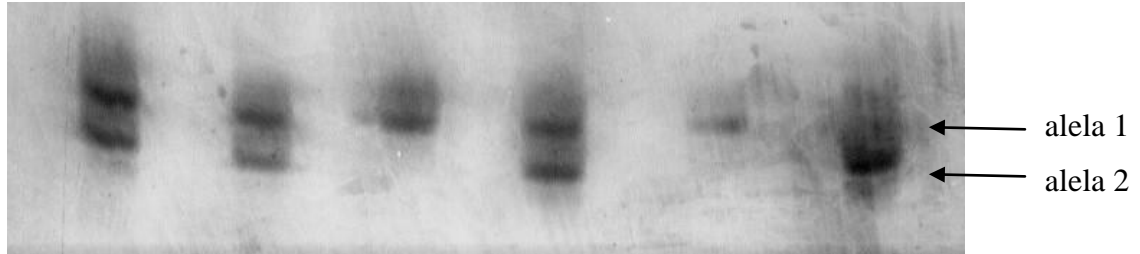
Po optimalizaci podmínek PCR a elektroforetické separace byly u každého mikrosatelitu u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče zjištěny jejich genotypy, které uvádím v tabulce č. 11.

**Tabulka č. 11:** Genotypy 19 polymorfních mikrosatelitových lokusů u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. V tabulce je uveden název polymorfního mikrosatelitního lokusu, zdroj, počet alel a genotyp.

Lokus	Původ mikrosatelitů	Počet alel	Genotyp
Ech005	Tučňák žlutorohý	6	$1/5$ $3/5$ $3/6$ $5/5$ $2/4$ $3/4$
Ech009	( <i>Eudyptes chrysolophus</i> )	2	$1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
Em1	Tučňák nejmenší ( <i>Eudyptula minor</i> )	2	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $1/2$
Em14		3	$3/3$ $2/3$ $3/3$ $3/3$ $1/3$ $3/3$
Em21		2	$1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/1$
Emm 5		2	$1/2$ $1/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
CAM-11	Konzervované ptačí mikrosatelity	5	$3/4$ $3/3$ $5/5$ $2/4$ $3/3$ $1/1$
CAM-17		2	$1/2$ $1/2$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $2/2$
CAM-19		4	$2/3$ $2/2$ $1/1$ $3/3$ $1/3$ $2/4$
CAM-23		6	$2/5$ $1/5$ $4/6$ $3/5$ $3/3$ $3/3$
CAM-24		4	$1/4$ $3/4$ $2/4$ $2/3$ $4/4$ $2/3$
TG01-040	Ptačí EST mikrosatelity	2	$1/2$ $1/1$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $1/1$
TG02-120		2	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $1/2$
TG03-002		3	$1/2$ $1/2$ $2/2$ $2/3$ $2/2$ $1/2$
TG03-098		2	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$
TG04-012		8	$5/8$ $6/6$ $7/7$ $1/2$ $2/3$ $4/5$
TG04-061		5	$1/4$ $3/3$ $2/3$ $3/5$ $2/3$ $2/3$
TG06-009		2	$1/2$ $1/2$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $2/2$
TG11-011		2	$1/3$ $2/2$ $1/1$ $2/2$ $2/2$ $2/2$

Pro odečtení výsledků z gelu – určení počtu alel u polymorfních mikrosatelitových lokusů, jsem pro každý mikrosatelit musela najít nejvhodnější podmínky jejich amplifikace (koncentrace hořčnatých iontů v PCR mixu, teplotu *annealingu*) a délku elektroforetické separace. Pokud jsou nalezeny optimální podmínky, bandy jsou ostré, viz obrázek č. 3 (mikrosatelit CAM-17 se dvěma alelami).

**Obrázek č. 3:** Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitu CAM-17 na šesti nepříbuzných jedincích potápky roháče. Tento mikrosatelit má dvě alely. Teplota *annealingu* byla v PCR reakci byla v případě tohoto mikrosatelitu 62 °C, délka elektroforetické separace 90 minut, koncentrace hořčnatých iontů 1,6 nmol/l. Šipky označují jednotlivé alely.



Tato práce pouze hledala polymorfní lokusy pro potápku roháče. Do budoucna by bylo vhodné otestovat tyto lokusy na větším počtu jedinců pro získání jejich charakteristiky (heterozygotnost, vypovídací hodnota mikrosatelitů, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, vazba mezi lokusy).

## 6 Diskuze

V experimentální části mé bakalářské práce jsem se zabývala testováním všech existujících 171 mikrosatelitních lokusů původně navržených pro řád tučňáci (113 párů primerů) – konkrétně pro druhy: tučňák žltorohý (*Eudyptes chrysolophus*), tučňák nejmenší (*Eudyptula minor*), tučňák žlutooký (*Megadyptes antipodes*), tučňák kroužkový (*Pygoscelis adeliae*), tučňák uzdičkový (*P. antarctica*), tučňák brýlový (*Spheniscus demersus*), tučňák Humboldtův (*S. humboldti*), tučňák galapážský (*S. mendiculus*) a tučňák magellanský (*Spheniscus magellanicus*); ptačí EST mikrosatelity (34 párů primerů) a konzervované ptačí mikrosatelity (24 párů primerů) na šesti nepříbuzných jedincích potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Polymorfismus jsem testovala pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace, našla jsem 19 polymorfních mikrosatelitů, které pocházely od tučňáka žltorohého, tučňáka nejmenšího, z ptačích EST mikrosatelitů a z konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Z řádu tučňáci jsem našla polymorfismus pouze u mikrosatelitů od tučňáka žltorohého a tučňáka nejmenšího. Monomorfní mikrosatelity testované pomocí *cross-species* PCR amplifikace pocházely od tučňáka brýlového, galapážského, Humboldtova, kroužkového, uzdičkového, žlutookého a magellanského.

U tučňáka žltorohého jsem našla polymorfismus u mikrosatelitů Ech005 a Ech009. U lokusu Ech005 jsem našla šest alel, ideální teplotu *annealingu* jsem stanovila na 64 °C a délku elektroforetické separace na 120 minut. V rámci lokusu Ech009 jsem našla dvě alely, délka elektroforetické separace 180 minut a teplota *annealingu* 68 °C. Ahmed *et al.* (2009) našli u lokusu Ech005 33 alel. Tento lokus testovali na 27 jedincích. U lokusu Ech009 objevili autoři osm alel a testovali ho na 28 jedincích.  $T_a$  u lokusů neuvádějí.

Od tučňáka nejmenšího jsem našla čtyři polymorfní mikrosatelity. Polymorfní mikrosatelitové lokusy měly 2-6 alel. Konkrétně se jednalo o mikrosatelity Em1, Em14, Em21 a Emm5. Pro pár primerů Em1 jsem zjistila nejvhodnější teplota *annealingu* 53 °C, mikrosatelit vykazoval dvě alely a optimální doba elektroforetické separace jsem stanovila na 90 minut. Na lokusu Em14 jsem našla tři alely, optimální teplota *annealingu* byla 65 °C a délka elektroforetické separace 150 minut. Dvě alely jsem objevila u mikrosatelitového lokusu Em21 při délce elektroforetické separace 90 minut a teplotě *annealingu* 57 °C. Optimální teplotu *annealingu* pro lokus Emm5 jsem

stanovila na 53 °C, elektroforetickou separaci na 90 minut, na tomto lokusu jsem zjistila dvě alely.

Grosser *et al.* (2014) našli 12 alel u lokusu Em1 (11 alel u populace tučňáků z Austrálie, 10 alel u populace tučňáků z Nového Zélandu), 10 alel u lokusu Em14 (devět alel u populace tučňáků z Austrálie, 10 alel u populace tučňáků z Nového Zélandu) a dvě alely u lokusu Em21 (dvě alely u populace tučňáků z Austrálie, dvě alely u populace tučňáků z Nového Zélandu). Teploty *annealingu* autoři stanovili na 53 °C.

Billings *et al.* (2006) u lokusu Emm5 objevili 11 alel u populace tučňáků z Filipova ostrova a osm alel u populace tučňáků z Troubridgeova ostrova.  $T_a$  určili na 58 °C. Počet testovaných jedinců se lišil u každého lokusu, odchylky byly také mezi počtem testovaných jedinců z Filipova a Troubridgeova ostrova. U tohoto lokusu hodnotili autoři polymorfismus na 28 jedincích z Filipova ostrova a na 15 jedincích z Troubridgeova ostrova.

Dále jsem zkoumala polymorfismus na šesti nepříbuzných jedincích potápky roháče od ptačích EST mikrosatelitů. Z 24 ptačích EST mikrosatelitů jsem zjistila polymorfismus u osmi lokusů. Lokusy vykazovaly 2-8 alel. Lokusy TG01-040, TG02-120, TG03-098, TG06-009 a TG11-011 měly dvě alely. Optimální teplotu *annealingu* pro mikrosatelit TG01-040 jsem stanovila na 64 °C a délku elektroforetické separace na 90 minut. Pro lokus TG02-120 jsem určila teplotu *annealingu* 63 °C s délkou elektroforetickou separace 120 minut. 54 °C byla vhodná teplota *annealingu* pro lokus TG03-098. Vhodnou dobu elektroforetické separace jsem určila na 180 minut. Další dvoualelový lokus byl TG06-009. Optimální délku elektroforetické seprace jsem stanovila na 90 minut, teplotu *annealingu* na 55 °C. Pro mikrosatelitový lokus TG11-011 jsem zjistila optimální elektroforetickou separaci 180 minut a teplotu *annealingu* 59 °C. Tři alely jsem detekovala u lokusu TG03-002, pro který jsem určila délka elektroforetické separace 90 minut a vhodnou teplota *annealingu* 54 °C. 150 minut byla optimální délka elektroforetické separace pro polymorfni mikrosatelit TG04-061 a teplota *annealingu* 49 °C. Na tomto mikrosatelitu jsem detekovala pět alel. Nejvíce alel v celé experimentální části mé bakalářské práce měl lokus TG04-012 – osm alel. Vhodnou teplotu *annealingu* jsem určila na 50 °C a délkou elektroforetické separace 120 minut.

Dawson *et al.* (2010) testovali ptačí EST mikrosatelity na 17 druzích pěvců a pěti druzích ostatních řádů (u každého druhu testovali čtyři jedince).  $T_a$  uvádějí autoři u všech lokusů 56 °C. Autoři popisují, díky vysoké úspěšnosti amplifikace, ptačí EST mikrosatelity jako mikrosatelity „univerzální“. Na těchto mikrosatelitech bylo popsáno 2-17 alel. Jednotlivé počty uvádí tabulka č. 12.

**Tabulka č. 12:** Počet alel u mikrosatelitů u zebříčky pestré a kura domácího a jeho divoké formy (Dawson *et al.*, 2010) porovnané s mými výsledky (počet alel u mikrosatelitů potápky roháče).

Lokus	Počet alel			
	Zebříčka pestrá (n = 4)	Kur domácí (n = 1)	Kur domácí – divoká forma (n = 4)	Potápka roháč (n = 6)
TG01-040	5	1	2	2
TG02-120	1	1	3	2
TG03-002	2	1	2	3
TG03-098	3	1	1	2
TG04-012	3	1	2	8
TG04-061	2	1	1	5
TG01-040	5	1	2	5
TG11-11	2	1	1	2

Legenda: n – počet testovaných jedinců

U konzervovaných ptačích mikrosatelitů jsem objevila polymorfismus u pěti mikrosatelitů z celkového počtu 34 mikrosatelitů. Jednalo se o CAM-11, CAM-17, CAM-19, CAM-23 a CAM-24. Optimální doba elektroforetické separace byla u všech EST mikrosatelitů 90 minut. Detekovala jsem 2-6 alel. Pro mikrosatelitový lokus CAM-11 jsem určila optimální teplotu *annealingu* 58 °C a objevila pět alel. Dvě alely vykazoval lokus CAM-17 a teplotu *annealingu* jsem stanovila na 62 °C. 64 °C byla vhodná teplota *annealingu* pro lokus CAM-19, na kterém jsem popsala čtyři alely. Lokus CAM-23 vykazoval šest alel a ideální teplota *annealingu* byla stanovena na 60 °C. Čtyři alely jsem našla u lokusu CAM-24 a stanovila teplotu *annealingu* na 54 °C.



Dawson *et al.* (2013) testovali *cross-species* PCR amplifikaci u zástupců 16 čeledí řádu pěvci a pěti dalších řádů. Konkrétně u zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura domácího (*Gallus gallus*) našly počet alel, který je uveden v tabulce č. 13. Tabulka č. 13 dále uvádí název lokusu a počet alel u obou uvedených druhů.  $T_a$  u PCR byla u všech uvedených mikrosatelitů 56 °C. Konkrétní počty testovaných jedinců u lokusů autoři neuvádějí.

**Tabulka č. 13:** Počet alel u zebřičky pestré a kura domácího (Dawson *et al.*, 2013).

Lokus	Počet alel		
	Zebřička pestrá (n = 12)	Kur domácí	Potápka roháč (n = 6)
CAM-11	6	1 (n = 4)	5
CAM-17	6	2 (n = 3)	2
CAM-19	6	1 (n = 4)	4
CAM-23	5	1 (n = 4)	6
CAM-24	6	1 (n = 4)	4

Legenda: n – počet testovaných jedinců

Pechová (2014) zkoumala *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Testovala celkem 169 párů primerů. Mikrosatelity byly odvozené od jedinců řádu brodiví, potápky a tučňáci. Dále testovala ptačí EST mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity – viz tabulka č. 14.

**Tabulka č. 14:** Mikrosatelity testované v bakalářské práci Pechová (2014). V tabulce je uveden původ mikrosatelitů, počet testovaných a polymorfních mikrosatelitů a celková úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů.

<b>Původ mikrosatelitů</b>	<b>Počet testovaných mikrosatelitů</b>	<b>Počet polymorfních mikrosatelitů</b>	<b>Úspěšnost [%]</b>
brodiví	23	3	13,04
potápky	11	1	9,09
tučňáci	77	10	12,99
CAM	24	3	12,50
EST ptačí mikr.	34	1	2,94
<b>celkem</b>	<b>169</b>	<b>18</b>	<b>10,65</b>

Při porovnání svých výsledků s výsledky Pechová (2014) nám vyšly polymorní produkty pouze u tří stejných lokusů: Ech005, CAM-11 a TG03-98. Celková úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů v práci Pechová (2014) byla stejně jako v této práci lehce nad 10 %.

Na téma hledání polymorfních mikrosatelitů u potápky roháče pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace již byla napsána bakalářská (Janušová, 2015) a diplomová práce (Hoffmannová, 2013).

Hoffmannová (2013) testovala 407 mikrosatelitů izolovaných od zástupců řádů potápky, potáplice, brodiví, veslonozí, plameňáci a několik mikrosatelitů od druhů řádu tučňáci (pouze jeden mikrosatelit AM13), vrubozobí a dlouhokřídli u 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče. Polymorfních lokusů našla 42 (viz tabulka č. 15). Celková úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů byla opět lehce nad 10 %.

**Tabulka č. 15:** Mikrosatelity testované v diplomové práci Hoffmannová (2013). V tabulce je uveden zdrojový řád, počet testovaných a polymorfních mikrosatelitů a celková úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů mezi všemi testovanými mikrosatelity.

Zdrojový řád	Počet testovaných mikrosatelitů	Počet polymorfních mikrosatelitů	Úspěšnost [%]
potápky	18	14	77,8
veslonozí	152	10	6,6
brodiví	168	9	5,3
plameňáci	45	7	15,6

Janušová (2015) testovala 213 mikrosatelitů izolovaných od řádu trubkonosí – konkrétně od zástupců čeledí buňňákovití, buňňáčkovití, pěvci, albatrosovití, alkovití, kulíkovití, lesňáčkovití, rackovití pomocí *cross-species* PCR amplifikace u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče. Polymorfních lokusů našla 20. Celková úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů opět odpovídá úspěšnostem předchozích prací.

Přehled *cross-species* PCR amplifikace u šesti nebo 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče je uveden v tabulce č. 16. Mikrosatelity byly původně navrženy pro řády brodiví, dlouhokřídli, pěvci, plameňáci, potápky, potáplice, trubkonosí, tučňáci, veslonozí, vrubozubí a dále konzervované ptačí mikrosatelity a EST ptačí mikrosatelity (Hoffmannová, 2013, Janušová 2015, tato práce).

**Tabulka č. 16:** Doposud testované mikrosatelity u šesti respektive 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče. V tabulce je uveden zdroj mikrosatelitů, od kterého byly mikrosatelity izolovány, počet testovaných a počet polymorfních mikrosatelitů a úspěšnost polymorfních mikrosatelitů.

Zdroj mikrosatelitů	Počet testovaných mikrosatelitů	Počet polymorfních mikrosatelitů	Úspěšnost [%]
*brodiví	168	9	5,4
dlouhokřídlí	*2; 5	*1; 0	X
*plameňáci	45	7	15,6
*potápky	18	14	77,8
*potáplice	7	0	0
trubkonosí	207	20	9,7
◇tučňáci	*1; 113	*0; 6	*0; 5,3
*veslonozí	152	10	6,58
*vrubozubí	13	1	X
CAM	24	4	20,8
EST ptačí mikr.	35	8	22,9
pěvci	1	0	X
<b>celkem</b>	<b>792</b>	<b>81</b>	<b>10,2</b>

Legenda:

\* – mikrosatelity testované na 13 nepříbuzných jedincích potápky roháče (zbytek testován na šesti nepříbuzných jedincích potápky roháče)

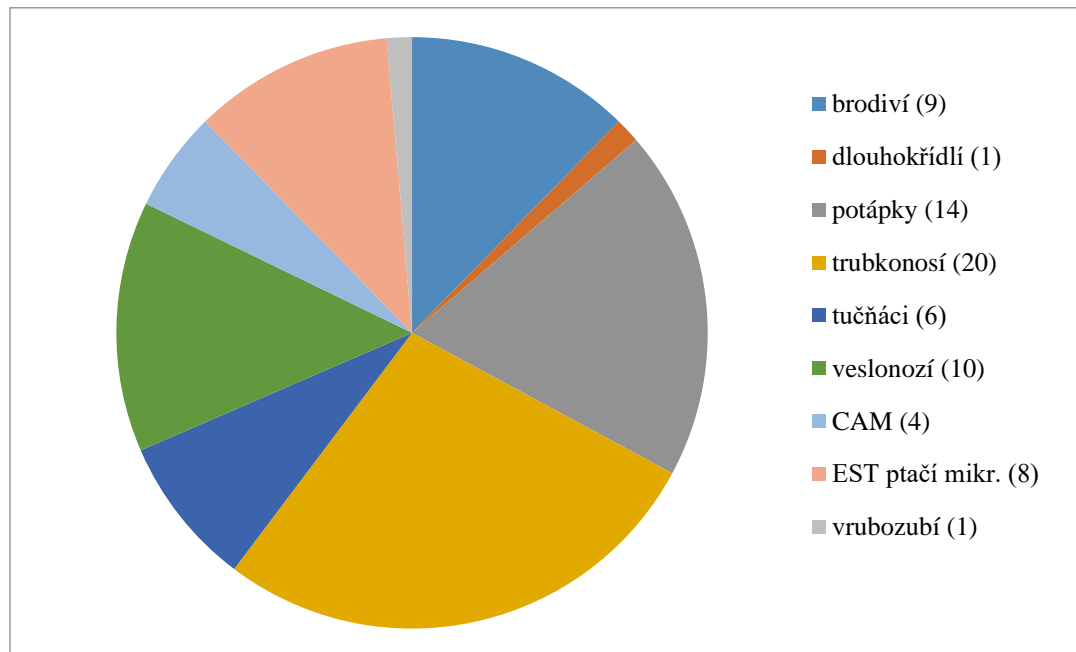
◇ – u řádu tučňáci byl testován stejný lokus (AM13) testován v mé práci i v práci Hoffmanová (2013)

X – u nekompletních skupin s výběrem mikrosatelitů nejsou uvedeny úspěšnosti PCR amplifikace

Největší úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů byla u mikrosatelitů od druhů ze stejného řádu, tedy potápky. Další velice úspěšné mikrosatelity byly konzervované ptačí mikrosatelity a EST ptačí mikrosatelity. Úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů souvisí s příbuzností v rámci kladu Aequorlitorornithes.

Graf č. 3 ukazuje rozdělení polymorfních mikrosatelitů podle řádů, od kterých byly mikrosatelity izolovány.

**Graf č. 3:** Rozdělení polymorfních mikrosatelitů testovaných u 13 a šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče podle řádů, od kterých byly mikrosatelity izolovány. Čísla v závorkách ukazují počet polymorfních mikrosatelitů u určitého řádu.



Vzhledem k tomu, že Hoffmannová (2013) našla polymorfní mikrosatelit mezi mikrosatelity testovanými od zástupců dlouhokřídli, kteří patří též do kladu Aequorlitorornithes, navrhuji do budoucna otestovat i tyto mikrosatelity, kterých je v současné době 363. V Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci bylo testováno zatím sedm z nich. Pokud vezmu v potaz, že průměrná úspěšnost získání polymorfních mikrosatelitů se v pracích pohybovala ve směs okolo 10 % (Hoffmannová, 2013; Pechová, 2014; Janušová, 2015 a tato práce) mohlo by testování mikrosatelitů od řádu dlouhokřídli přinést dalších asi 30 polymorfních mikrosatelitů. Nyní je zjištěno u potápky roháče 81 polymorfních mikrosatelitů, v budoucnu by počet polymorfních mikrosatelitů mohl být vyšší než sto.

## 7 Závěr

V bakalářské práci jsem se zabývala testováním 171 mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) metodou *cross-species* PCR amplifikace. K tomuto testování jsem použila všechny doposud známé mikrosatelity z řádu tučňáci, ptačí EST mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity.

113 mikrosatelitů bylo navrženo pro řád tučňáci – konkrétně pro druhy: tučňák žltorohý (*Eudyptes chrysolophus*), nejmenší (*Eudyptula minor*), žlutooký (*Megadyptes antipodes*), kroužkový (*Pygoscelis adeliae*), uzdičkový (*P. antarctica*), brýlový (*Spheniscus demersus*), Humboldtův (*S. humboldti*), galapážský (*S. mendiculus*) a magellanský (*S. magellanicus*); 34 ptačích EST mikrosatelitů a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Nalezla jsem 19 polymorfních mikrosatelitů. Polymorfizmus vykazovaly mikrosatelity od tučňáka žltorohého (dva), tučňáka nejmenšího (čtyři), ptačí EST mikrosatelity (pět) a konzervované ptačí mikrosatelity (osm). U těchto polymorfních lokusů jsem určila teplotu *annealingu* ( $T_a$ ) (44-68 °C), počet alel (2-8) a délku elektroforetické separace (90-180 minut).

Nejvyšší úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů jsem zjistila u ptačích EST mikrosatelitů, kde bylo polymorfních osm z 34 zkoumaných mikrosatelitů, úspěšnost byla tedy 23,5 %. Mezi tyto mikrosatelity patřil i mikrosatelit TG04-12, u něhož jsem objevila osm alel.

## 8 Seznam použitých zkratek

A	adenin
bp	pár bází ( <i>base pair</i> )
C	cytozin
CAM	konzervované ptačí mikrosatelity ( <i>Conserved Avian Microsatellite</i> )
DNA	deoxyribonukleová kyselina ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
EST	krátke repetitivní úseky cDNA ( <i>Expressed Sequence Tag</i> )
G	guanin
kb	kilobáze
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
SSRs	jednoduché repetitivní sekvence ( <i>Simple Sequence Repeats</i> )
T	tymin
Ta	teplota <i>annealingu</i> ( <i>Annealing Temperature</i> )

## 9 Použitá literatura

Ahmed S, Hart T, Dawson DA, Horsburgh GJ, Trathan NP, Rogers AD (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9: 1530-1535.

Akst EP, Boersma PD, Fleischer RC (2002): A comparison of genetic diversity between the Galapagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3: 375-383.

Anonymous (2012): The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012-1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Navštíveno dne: 13. 3. 2016.

Banks JC, Mitchell AD, Waas JR, Paterson AM (2002): An unexpected pattern of molecular divergence within the blue penguin (*Eudyptula minor*) complex. *Notornis*, 49: 29–37.

Billing TM, Guay P-J, Peucker J, Mulder RA (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 TM, Seddon PJ, Waters JM (2008): Isolation and characterization of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources*, 8: 1043-1045.

Bruford MW, Wayne RK (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics & Development*, 3: 939-943.

Burnie D (Ed.) (2002): *Zvíře*. Knižní Klub, Praha.

Dakin EE, Avise JC (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.



Dawson DA, Ball AD, Spurgin LG, Martín-Gálvez D, Stewart IRK, Horsburgh GJ, Potter J, Molina-Morales M, Bicknell AWJ, Preston SAJ, 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 DA, Horsburgh GJ, Küpper C, Stewart IK, Ball AD, Durrant KL, Hansson B, Bacon I, Bird S, Klein Á, Krupa AP, Lee J, Martín-Gálvez D, Simeoni M, Smith G, Spurgin LG, Burke T (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10: 475-494.

Ellegren H (1992): Polymerase chain reaction (PCR) of microsatellites – a new approach to studies of genetic relationships in birds. *Auk*, 109: 886-895.

Ellegren H, Primmer CR, Sheldon BC (1995): Microsatellite 'evolution': directionality or bias? *Nature Genetics*, 11: 361-362.

Fjeldså J (1994): Potáplice a Potápky. In: Homolová Š. (Ed.): *Obratlovci: savci, ptáci, obojživelníci, plazi: encyklopedický průvodce světem zvířat*. Nakladatelský dům OP, Praha.

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

Gärke C, Ytournel F, Bed'hom B, Gut I, Lathrop M, Weigend S, Simianer H (2012): Comparison of SNPs and microsatellites for assessing the genetic structure of chicken populations. *Animal Genetics*, 43: 419-428.

Garner TWJ, Gautschi B, Rothlisberger S, Reyer H-U (2000): A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae*. *Molecular Ecology*, 9: 2173-2174.

Glenn TC, Schable NA (2005): Isolating microsatellite DNA loci. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data: Part B* (Ed. Zimmer EA, Roalson EH), 202-222. Elsevier Academic Press, San Diego, California.

Gosler A (1994): *Atlas ptáků světa*. Příroda a. s., 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.

Hansson B, Tarka M, Dawson DA, Horsburgh GJ (2012): Hybridization but no evidence for backcrossing and introgressing in a sympatric population of great reed warblers and clamorous reed warblers. *PLoS One*, 7: e31667.

Hauser L, Baird M, Hilborn R, Seeb LW, Seeb JE (2011): An empirical comparison of SNPs and microsatellites for parentage and kinship assignment in a wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population. *Molecular Ecology Resources*, 11: 150-161.

Hillier DW, Miller W, Birney E, Warren W, Hardison RC, Ponting PC, Bork P, Burt WD, Groenen MAM, Delany EM, Dodgson BJ (2004): International Chicken Genome Sequencing Consortium: Sequencing and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432: 695-716.

Hoffmannová J (2013): *Analýza a charakteristika polymorfních cross-species mikrosatelitů u potápky roháče (Podiceps cristatus)*. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Howard R, Moore A (1991): *A complete checklist of the birds of the world*. Academic Press, London.

del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J (1992): *Handbook of the Birds of the World. Volume 1, Ostrich to Ducks*. Lynx Edicions, Barcelona.

Hudec K, Černý W (1972): *Fauna ČSSR, Ptáci 1*, Academia, Praha.

Janušová D (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Kang S, Jung JW, Ahn DH, Lee JE, Kim JH, Park H (2015): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the chinstrap penguin, *Pygoscelis antarctica*. Conservation Genetic Resources, 7: 561-563.

Karunasena E, Mciver LJ, Bavarva JH, Wu X, Zhu H, Garner HR (2015): Cut from the same cloth: Shared microsatellite variants among cancers link to ectodermal tissues-neural tube and crest cells. Oncotarget, 6: 22038-47.

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004): MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. Briefings in Bioinformatics, 5: 150-163.

Labuschagne Ch, van Wyk AM, Kotze A, Grobler P, Dalton DL (2013): Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). Conservation Genetic Resources, 5: 169-171.

Lawson MJ, Liqing Zhang L (2006): Distinct patterns of SSR distribution in the *Arabidopsis thaliana* and rice genomes. Genome Biology, 7: R14.

Li D, Deng Z, Qin B, Liu X, Men Z (2012): *De novo* assembly and characterization of bark transcriptome using Illumina sequencing and development of EST-SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). BMC Genomics, 13: 192.

Oliveira EJ, Gomes Pádua J, Imaculada Zucchi M, Vencovsky R, Carneiro Vieira ML (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology, 29: 294–307.

Pechová A (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta indomalajského (*Mycteria*

*leucocephala*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Davis, LS (2015): Penguinworld. navštíveno online na [www.penguinworld.com](http://www.penguinworld.com) dne (29. 12. 2015).

Primmer CR, Muller AP, Ellegren H (1996): A wide-range survey of *cross-species* microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5: 365-378.

Prum RO, Jacob S, Berv JS, Dornburg A, Field DJ, Townsend JP, Lemmon EM, Lemmon AR (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next generation DNA sequencing. *Nature*, 526: 569-573.

Raymond M, Rousset F (1995): GENEPOP (version 1.2). Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.

Roeder AD, Marshall RK, Mitchelson AJ, Visagathilagar T, Ritchie PA, Love DR, Pakai TJ, McPartlan HC, Murray ND, Robinson NA, Kerry KR, Lambert DM (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10: 1645-1656.

Rozen S, Skaletsky HJ (2000): PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (Ed.: Krawetz S, Misener S). Humana Press, Totowa, NJ: 365-386.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd (Ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press), Cold Spring Harbor, NY.

Scribner KT, Pearce JM (2000): Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. *Molecular Methods in Ecology*: 235-273.

Schlosser JA, Dubach JM, Garner TWJ, Araya B, Bernal M, Simeone A, Smith KA, Wallace RS (2008): Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin. *Spheniscus humboldti*. Conservation Genetics, 10: 839-849.

Schlosser JA, Garner TWJ, Dubach JM, McElligott AG (2003): Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. Molecular Ecology Notes, 3: 62-64.

Schlötterer C, Tautz D (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research, 20: 211-215.

Slate J, Hale MC, Birkhead TR (2007): Simple sequence repeats in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) expressed sequence tags: a new resource for evolutionary genetic studies of passerines. BMC Genomics: 4, 8.

Sokal RR, Rohlf FJ (1987): Introduction to Biostatistics, 2nd Ed.: WH Freeman, New York.

Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD (1993): Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. Nature, 365: 274-6.

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

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005): Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends Biotechnology, 23: 48-55.

Wang L., Wang Z., Chen J., Liu C., Zhu W., Wang L., Meng L. (2015): De Novo Transcriptome Assembly and Development of Novel Microsatellite Markers for the Traditional Chinese Medicinal Herb, *Veratilla baillonii* Franch (Gentianaceae). Evolutionary Bioinformatics Online, 11: 39-45.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology, 11: 1-16.