

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2012**

**Lenka Schořová**

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká Fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Nový systém molekulární  
determinace pohlaví u volavek a jeho  
aplikace u dalších vodních ptáků**

**Bakalářská práce**

**Lenka Schořová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

**Olomouc 2012**

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s pomocí vedoucího RNDr. Petra Nádvořníka, Ph.D. a že uvádím veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne 10. srpna 2012.

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho užitečné rady, cenné připomínky, ochotu a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále mnohokrát děkuji za poskytnutí potřebného materiálu k experimentální části. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině, která mi byla v průběhu vypracovávání bakalářské práce oporou a poskytla mi vynikající zázemí.

## SOUHRN

Determinace pohlaví u ptáků pomocí molekulárně genetických metod umožňuje pochopení struktury a dynamiky populací, stanovení poměru jedinců odlišného pohlaví u ohrožených druhů žijících ve volné přírodě, a chov především druhů čelících vymření. Analýza DNA za použití metody PCR a elektroforetického rozdělení PCR produktů nabízí rychlou, nenákladnou a vysoce spolehlivou metodu pro určení pohlaví u ptáků.

Rozlišení pohlaví u ptáků je mnohdy velmi nesnadný úkol. Jelikož více než 50 % všech světových druhů nevykazuje výraznější rozdíly ve velikosti těla, zbarvení opeření nebo specifickém chování, přistupuje se obvykle k analýze ptačích pohlavních chromozomů.

Samci jsou pohlaví homogametického, tvořící pouze gamety nesoucí Z pohlavní chromozomy, naopak samice jsou heterogametické, typické přítomností gonozomů Z a W. Na chromozomu Z i na chromozomu W byla již identifikována řada genů. Jedním z nich je i ústřední gen pro determinaci pohlaví, který se vyskytuje se na obou typech chromozomů. Tento gen CHD1 kóduje chromohelicase-DNA-binding protein 1, jehož funkce souvisí s transkripční regulací, avšak nesouvisí s determinací pohlaví jako takovou. Skutečnost, že lze rozlišit pohlaví na základě CHD1 genů, je dána rozdílnou délkou sekvencí intronových úseků v rámci těchto genů. Navržené primery pro PCR amplifikaci jsou kompletní k vysoce zakonzervovaným exonovým sekvencím, avšak amplifikují i evolučně méně stabilní introny. Jelikož introny CHD1Z a CHD1W genů se liší počtem nukleotidových bází, lze u samců identifikovat jeden produkt a u samic dva (popř. u samců dva a u samic čtyři při separaci za denaturujících podmínek).

V této bakalářské práci bylo stanovováno pohlaví PCR amplifikací intronových sekvencí CHD1 genů s využitím primerů P2/P8 a P8/WZ-common/W-specific (dále jen P8/WZ/W) u 25 druhů ptáků reprezentujících 5 řádů. U 12 druhů podávala PCR amplifikace s použitím páru primerů P2/P8 i sady primerů P8/WZ/W jasné výsledky rozlišující samce od samic. U ostatních druhů nevykazovaly produkty amplifikované primery P2/P8 žádné rozdíly mezi samci a samicemi. Při použití primerů P8/WZ/W byly obdrženy zajímavé výsledky: v očekávané produktové velikosti (250-300 bp) se vyskytly standardní amplikony nerozlišující typ pohlaví, ovšem byly vizualizovány produkty o asi třetinové velikosti těchto standardních produktů, a to pouze u samic.

## SUMMARY

Sex determination in birds using the molecular-genetic approach enables understanding of the structure and dynamics of the bird population, estimation of the sex ratio of endangered species in wildlife, and breeding of especially species facing extinction. DNA analysis employing polymerase chain reaction (PCR) and electrophoretic gel separation of PCR products offer a rapid, inexpensive and highly reliable method for sexing of birds.

Identification of the sex of a bird is often not an easy task. Because of more than 50% of bird species all over the world cannot be sexed by morphological differences or specific behaviour, examination of the sex chromosomes takes a turn.

Male birds possess two Z chromosomes (ZZ) whereas females are of heterogametic constitution and have one chromosome Z and one W (ZW). Many genes have been identified within these chromosomes. One of these genes, CHD1, plays a pivotal role in sex identification in birds and is localized in both types of the sex chromosomes. CHD1 gene encodes for chromo-helicase-DNA-binding protein 1 which acts as a transcriptional regulator and is not directly associated with sex differentiation. The ability of the sex determination using CHD1 genes is based on different length of intronic regions within the CHD1Z as compared with CHD1W. Designed PCR primers match to highly conserved exonic sequences, however amplify evolutionary less stable introns. Intronic length difference between CHD1Z and CHD1W is therefore involved in sex identification where the males produce one PCR product and female two (in the case of denaturing conditions there is one double band in males and two double bands in females).

This bachelor thesis pursues sex identification in birds using PCR amplification with P2/P8 and P8/WZ-common/W-specific primers of CHD1 intronic sequences in 25 bird species covering 5 orders. Both sets of primers P2/P8 and P8/WZ/W allowed distinguishing the sex of 12 bird species. Although the rest of the examined birds were sexed either only by using P8/WZ/W set of primers or they were indistinguishable, it should be mentioned that all of the examined female birds have shown unexpected products in size of one third by comparison with usual P8/WZ/W amplified products.

# OBSAH

<b>1. Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3. Současný stav řešené problematiky.....</b>	<b>10</b>
3. 1 Charakteristika studovaných ptáků .....	10
3. 1. 1 Charakteristika čeledě pelikánovitých (Pelecanidae) .....	10
3. 1. 2 Charakteristika čeledě volavkovitých (Ardeidae).....	10
3. 1. 3 Charakteristika čeledě ibisovitých (Threskiornithidae).....	10
3. 1. 4 Charakteristika čeledě kladivoušovitých (Scopidae).....	11
3. 1. 5 Charakteristika čeledě čápoovitých (Ciconiidae) .....	11
3. 1. 6 Charakteristika čeledě plameňákovitých (Phoenicopteridae).....	11
3. 1. 7 Charakteristika čeledě potápkovitých (Podicipedidae).....	11
3. 2 Identifikace pohlaví u ptáků.....	12
3. 3 Molekulárně genetická fakta o pohlaví ptáků .....	13
3. 4 Proces evoluce ptačích pohlavních chromozomů .....	14
3. 5 Vývoj technik pro determinaci pohlaví u ptáků.....	14
3. 5. 1 Historie objevu klíčového genu pro identifikaci pohlaví u ptáků.....	16
3. 5. 2 Lokalizace CHD1-A genu na Z chromozomu .....	20
3. 5. 3 Charakteristika CHD1W a CHD1Z genů a jejich produktů .....	21
3. 6 Přehled na PCR založených metod určujících pohlaví u ptáků .....	23
3. 6. 1 RFLP .....	23
3. 6. 2 RADP.....	24
3. 6. 3 Tandemové repetice .....	24
3. 6. 4 SSCP .....	25
3. 7 PCR amplifikace intronové oblasti CHD1 genů .....	26
<b>4. Materiál a metody .....</b>	<b>32</b>
4.1 Materiál .....	32
4. 2 Fenol-chloroformová izolace genomové DNA.....	32
4. 3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	33
4. 4 Elektroforetické dělení PCR produktů .....	34
4. 5 Chemikálie a zásobní roztoky .....	37
4. 5. 1 Chemikálie .....	37
4. 5. 2 Příprava roztoků .....	37

4. 6	Přístrojové vybavení laboratoře .....	39
4. 7	Ostatní vybavení laboratoře .....	40
4. 8	Tvorba obrázků, schématu a tabulek.....	40
<b>5.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>41</b>
5. 1	Analýza pohlaví u ptáků pomocí P2/P8 a P8/WZ/W PCR primerů.....	45
5. 1. 1	Analýza pohlaví u pelikánovitých.....	45
5. 1. 2	Analýza pohlaví u volavkovitých .....	45
5. 1. 3	Analýza pohlaví u ibisovitých a čápovitých .....	46
5. 1. 4	Analýza pohlaví u plameňákovitých a potápkovitých .....	50
5. 1. 5	Analýza pohlaví u 3 druhů z řádu pěvců.....	52
<b>6.</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>70</b>



# 1 ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá určováním pohlaví u ptáků zvláště z řádů veslonozí a brodiví pomocí metody PCR amplifikace specifických DNA úseků lokalizovaných na ptačích W a Z pohlavních chromozomech.

Wang *et al.* (2010) ve své práci navrhli na základě přítomnosti méně konzervovaných intronových úseků CHD1W a CHD1Z genů amplifikovaných při použití primerů P2 a P8 primery WZ common a W-specific nasedající na evolučně vysoce stabilní exonové oblasti. Ve studii čínských vědců se nově navržené primery osvědčily pro přesnou a spolehlivou identifikaci pohlaví u deseti druhů ptáků z čeledi volavkovití. Tato data předpokládají širší využití těchto primerů pro stanovení pohlaví v rámci volavkovitých druhů.

Navržené primery pro PCR amplifikaci P2 a P8 (Griffiths *et* Tiwari, 1995; Griffiths *et al.*, 1998) a WZ-common a W-specific (Wang *et al.*, 2010) byly v experimentální části této bakalářské práce použity u ptáků z řádů brodiví, veslonozí a dalších vodních ptáků ke stanovení pohlaví. Determinace tří druhů z řádu pěvců byly využity k porovnávací analýze, jelikož kvůli fylogenetické nepříbuznosti, nebyly očekávány pozitivní výsledky.

## **2 CÍLE PRÁCE**

1. Vypracování literární rešerše na téma molekulární určování pohlaví u ptáků.
2. Aplikace trojkombinace primerů P8/WZ/W pro amplifikaci CHD1 genových úseků pro identifikaci pohlaví u volavkovitých a rozšíření použití těchto primerů na další druhy z řádů brodiví, veslonozí, plameňáci a potápky.
3. Využití kombinace PCR primerů P2/P8 jako referenčních pro určení pohlaví.
4. Vyhodnocení získaných výsledků.

## 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 3.1 Charakteristika studovaných ptáků

---

Systematické studie u ptáků vyúsťující v jejich klasifikaci a fylogenetické zařazení jsou mnohdy velmi sporné, především co se týče rozdílů morfologických studií oproti molekulárním analýzám (DNA-DNA hybridizace, mitochondriální genomy, rozdílné sekvence exonů a intronů, ribozomální RNA). Z dosavadních literárních zdrojů se odhaduje, že řady brodivých a veslonohých se vývojově částečně překrývají (Hackett *et al.*, 2008).

#### 3.1.1 Charakteristika čeledě pelikánovitých (Pelecanidae)

Pelikáni patří k nejtěžším létajícím ptákům. Tito vodní ptáci mají charakteristickou anatomii končetin. Krátké nohy jsou posunuty do zadní části těla, což spolu s plovací blánou, která se vyskytuje mezi všemi čtyřmi prsty dolní končetiny, umožňuje pelikánům výkonně pádlovat. Dalším typickým rysem je přítomnost extrémně roztažitelného hrdelního vaku ve spodní čelisti zobáku. Tento vak je schopen pojmout až čtrnáct litrů vody. Pelikáni pohlavně dospívají ve věku 3-5 let a v přírodě se dožívají až 25 let. Pelikáni se živí výhradně rybami, a proto jsou jejich typickou nikou pobřežní mořské vody.

#### 3.1.2 Charakteristika čeledě volavkovitých (Ardeidae)

Zástupci této čeledě patří ke středně velkým až velkým ptákům většinou s dlouhými štíhlými nohama a protáhlým krkem. Zobák je typicky klínovitý se špičatým zakončením. Speciální anatomická úprava šestého krčního obratle umožňuje charakteristické esovité prohnutí krku. Tito ptáci hnízdí nejčastěji v bažinných oblastech až mělkých vodách, pouze několik druhů obývá louky. Živí se hmyzem, rybami, obojživelníky, plazy i drobnými savci.

#### 3.1.3 Charakteristika čeledě ibisovitých (Threskiornithidae)

Ibisi a kolpíci jsou středně velcí až velcí ptáci (45-135 cm) s dlouhými tenkými nohama, s protáhlým krkem a dlouhým zobákem. Samci i samice jsou stejně zbarvení,

avšak často se liší výškou. Obývají mokřady, někdy suché louky, v teplejších oblastech po celém světě. Živí se korýši, obojživelníky, hmyzem, měkkýši a drobnými rybami.

#### **3. 1. 4 Charakteristika čeledě kladivoušovitých (Scopidae)**

Kladivouši jsou mohutného vzrůstu připomínající menší čápy s kratšíma a silnějšíma nohama. Měří do 60 cm a obývají bažinatá území. Hnízdo, které spíš připomíná obrovskou kouli, si staví z bahna na stromech. Živí se stejnou potravou jako ibisovití.

#### **3. 1. 5 Charakteristika čeledě čápoovitých (Ciconiidae)**

Jedná se o vysoké ptáky s dlouhýma nohama a mohutnými křídly. Hnízdí obvykle v párech na stromech nebo vyvýšených místech. Obývají teplé oblasti všech kontinentů, někteří ze zástupců jsou stěhovaví. Výlučně živočišnou potravu loví nejčastěji v mělké vodě.

#### **3. 1. 6 Charakteristika čeledě plameňákovitých (Phoenicopteridae)**

Velmi stará skupina ptáků, která se vyvinula asi před 50 miliony let. Obě pohlaví těchto vysokých ptáků jsou stejně zbarvena, samice bývají o něco menší než samci. Vyznačují se dlouhýma nohama bez opeření a charakteristickým silným lomeným zobákem. Typické je pro plameňáky zbarvení opeření, které je růžovo-červené až krvavé s černými letkami. Potrava se skládá především z ryb.

#### **3. 1. 7 Charakteristika čeledě potápkovitých (Podicipedidae)**

Vodní ptáci téměř kachnovitého vzrůstu hnízní obvykle ve stojatých vodách. Potápky jsou schopny se potopit až do hloubky sedmi metrů. Velmi neobvyklým jevem je u nich polykání peří, kterým si tak chrání stěny žaludku před ostrými rybími kostmi.

Pozn. Ke zpracování charakteristik uvedených čeledí byly využity tyto zdroje: Nicolai *et al.*, 2002; Svensson *et Grant*, 2004; Dungenl *et Hudec*, 2011.

### 3. 2 Identifikace pohlaví u ptáků

---

Determinace pohlaví u ptáků je u většiny druhů velmi obtížná. U více než 50 % ptačích druhů na celém světě nelze na základě fenotypových znaků rozlišit samčí pohlaví od samičího. U mláďat je určení pohlaví ještě mnohem komplikovanější.

Ačkoli u mnoha druhů lze pohlaví jednoznačně identifikovat podle typického opeření, výrazné rozdílnosti morfologie těla, anebo specifického chování, např. charakteristické zvuky a námluvy nebo určité pozice jedinců při kopulaci, tato problematika související s určením pohlaví u ptáků znesnadňuje studium evoluce, struktury populací, systematických oborů, ekologických odvětví, popř. asistovaný chov (Griffiths *et al.*, 1998; Kloskowski *et al.*, 2006).

Příkladem může být výzkum, který probíhal v letech 1996-2005 na území Polska v rámci ptačích párů. Snaha vědců byla soustředěna na stanovení morfologických kritérií sexuálního dimorfismu u potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*) a zároveň ověření pravdivosti a spolehlivosti získaných výsledků molekulární metodou identifikace pohlaví na úrovni DNA. Avšak kvůli značným nesrovnalostem v biometrických měřeních, např. délka zobáku, tělesná hmotnost, délka křídel, a v porovnání s molekulárním přístupem identifikace pohlaví, vědci nemohli výsledky z biometrických měření považovat za přesvědčivé pro určení pohlaví u potápky rudokrké (Kloskowski *et al.*, 2006). Také japonští vědci, kteří porovnávali výsledky získané z měření karpálního výběžku u čejky šedohlavé (*Vanellus cinereus*), který je u samců výrazně delší, a jiných morfologických měření, a analýzy pohlaví amplifikací úseků CHD1 genů za využití primerů 2250F a 2718R (Fridolfsson *et al.*, 1999) došli k závěru, že u tohoto ptačího druhu je molekulární analýza nezbytná (Wakisaka *et al.*, 2006).

Řešení spolehlivé identifikace pohlaví u ptáků by mohlo nabízet bližší prozkoumání vnějších pohlavních orgánů. U obou pohlaví jsou však externí genitálie tvořeny kloakou. Jedná se o dutinu, do které ústí intestinální a genitourinární trakt. Morfologie kloaky je sexuálně uniformní (neplatí pro kachny a labutě). Další možností je přímé prozkoumání gonád pomocí operačních metod, jako je laparotomie a laparoskopie, při kterých podstoupí vyšetřovaný jedinec lokální anestezii. U laparotomie je řez veden na břišní straně mezi dvěma posledními žebry, tento řez musí být dostatečně velký pro vložení kovové sondy. U laparoskopie je nutný pouze drobný vpich, který umožní zavedení optického kabelu. Samci mají jeden pár varlat, kdežto samice mají obvykle

jednoduchý vaječník, který je lokalizován na levé straně těla. Tyto operační techniky jsou velmi riskantní, a nelze je provádět u velmi malých ptáků nebo u mlád'at (Ellegren *et Sheldon*, 1997; Griffiths *et Phil*, 2000).

Mezi další metody determinace pohlaví u ptáků jsou řazena cytologická vyšetření, při kterých se ověřuje přítomnost či nepřítomnost W chromozomu, který je unikátní pro samice. K chromozomovému nátěru se obvykle používá kultura živých buněk získaná z dřeneš ptačího pera po přepeřování. Nevýhody této metody spočívají ve vysokém počtu chromozomů, který se často pohybuje kolem 80, což znesnadňuje rozlišitelnost jednotlivých chromozomů, a tímto se tento postup stává zdlouhavým (Ellegren *et Sheldon*, 1997; Griffiths *et Phil*, 2000).

Jako nejvhodnější metoda se jeví determinace molekulárně genetickými metodami (Griffiths *et Korn*, 1997; Dubiec *et Zagalska-Neubauer*, 2006).

### **3. 3 Molekulárně genetická fakta o pohlaví ptáků**

---

Ptačí pohlaví je rozlišeno na samce a samice. Jak již bylo zmíněno, u mnoha ptáků nelze identifikovat pohlaví na základě kvalitativních znaků, avšak tento dimorfismus lze rozlišit na úrovni DNA/chromozomů. Jedná se o tzv. chromozomální/genomovou determinaci pohlaví, u které jsou faktory související s determinací pohlaví lokalizovány na pohlavních chromozomech (z angl. Chromosomal/Genome Sex Determination neboli C/GSD), (Fridolfsson *et al.*, 1998; Valenzuela, 2004).

Ptáci náležejí k pohlavnímu typu *Abaxas*. Tento pohlaví typ je opačné chromozomové konstituce nežli typ *Drosophila*, charakteristický pro savce. Samičí pohlaví typu *Abaxas* nese jednu kopii chromozomu Z a jednu kopii chromozomu W, je tedy heterogametické (ZW). U homogametických samců se vyskytují dvě kopie gonozomu Z (ZZ).

Rozdílnost v chromozomové výbavě mezi samicemi a samci se využívá v diagnostice pohlaví u většiny eukaryontních organismů, a tedy i u ptáků, kdy se zjišťuje přítomnost či nepřítomnost pro samice unikátního W chromozomu (Griffiths *et Tiwari*, 1993). Nejnovější metody stanovující pohlaví jsou založeny na PCR amplifikaci intronových úseků mezi geny vyskytujícími se na obou pohlavních chromozomech (Griffiths *et al.*, 1998; Kahn *et al.*, 1998; Fridolfsson *et Ellegren*, 1999; Wang *et Zhang*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

### 3.4 Proces evoluce ptačích pohlavních chromozomů

---

Pohlavní rozmnožování se vyskytuje napříč eukaryontními organismy. Během evoluce se vyvinula celá řada mechanismů pro vznik samčího a samičího pohlaví. Mezi nejrozšířenější mechanismus diferencující pohlaví patří již zmíněný typ C/GSD charakteristický existencí s pohlavím spojených genetických faktorů lokalizovaných na gonozomech. Dalšími mechanismy mohou být, např. cytoplasmatická determinace pohlaví, kdy tzv. cytoplasmatické genetické elementy mohou ovlivnit vznik pohlaví (Yamauchi *et al.*, 2010), u na prostředí závislé determinace pohlaví, která se vyskytuje u želv, hadů a ještěřů, je pro vznik pohlaví rozhodující teplota okolního prostředí a pohlaví nemůže být předpovězeno z genotypu, atd. (Valenzuela, 2004).

Ovšem jak se pohlavní chromozomy u C/GSD živočichů vyvinuly? Evoluce odlišných typů pohlavních chromozomů probíhala nezávisle v rámci mnoha taxonů. Analýzou savčích genomů bylo dokázáno, že geny na Y chromozomu jsou „relikty“ genů na X chromozomu, že sdílí řadu homologních úseků. Tento fakt naznačuje původ pohlavních chromozomů v autozomech společného předka. Pomocí srovnávacího genomového mapování a fylogenetických studií u savců se předpokládá, že tento vztah platí i pro ptačí pohlavní chromozomy. Tuto teorii podporuje skutečnost, že na gonozomu W jsou lokalizovány úseky (geny CHD1 a ATP5A1), které se vyskytují v kopiích na Z chromozomu (Fridolfsson *et al.*, 1998). Ohno (1967) ve své práci navrhuje myšlenku společného autozomálního předka jak pro X-Y tak Z-W chromozomy. Data publikována Graves (1995) a Fridolfsson *et al.* (1998) však tuto ideu vyvracejí.

Proces vývoje pohlavních chromozomů se předpokládá následujícím způsobem: určitá sekvence v rámci genomu si postupně osvojuje roli pohlavní determinanty pomocí potlačení rekombinace, změnou strukturního uspořádání a degradací chromozomu nesoucího již pohlaví určující gen. Jako klíčový se jeví proces crossing-overu mezi X a Y (Z a W), přičemž gonozomy Y a W si ponechávají esenciální geny a nepotřebných se takto zbavují (Fridolfsson *et al.*, 1998; Roldan *et al.*, 1999).

### 3.5 Vývoj technik pro determinaci pohlaví u ptáků

---

Řada technik se z počátku soustředila na nalezení vhodného markeru pro označení W chromozomu. Tento z velké části nerekombinující chromozom vykazuje nízkou

úroveň polymorfismu, ve srovnání s autozomy až sedminovou, je poměrně malý a obsahuje velké množství nekódující repetitivní DNA. Takovéto úseky DNA se rychle vyvíjejí i v rámci blízkce příbuzných druhů (Griffiths *et* Tiwari, 1993; Ellegren, 1996; Berlin *et* Ellegren, 2004).

Pro určení pohlaví připadalo v úvahu použití tandemových mikrosatelitových repetitiv, např. ACACACACACAC, nebo delších minisatelitových repetitivních sekvencí. Mikro/minisatelitové markery situované na W chromozomu se hledaly metodou, která obnášela použití restričních enzymů. Po enzymatickém sestříhání a elektroforetické separaci byla provedena hybridizační analýza, DNA byla přenesena na nylonovou membránu a inkubována se značenou DNA sondou. Pokud sekvence typické pro samice hybridizovaly s W chromozomem, jednalo se o samice. Jako kontrola sloužila hybridizace sekvence společná pro obě pohlaví (Griffiths, 1992). Ukázalo se ovšem, že tento postup často selhával a byl časově náročný. Proto byl postupně nahrazen metodou PCR s párem navržených primerů, které amplifikují požadovaný fragment DNA (Griffiths *et* Tiwari, 1993; Griffiths *et al.*, 1998; Dubiec *et* Zagalska-Neubauer, 2006).

Griffiths *et* Tiwari (1993) popsali metodologii identifikace molekulárně genetických markerů pro stanovení pohlaví na základě použití náhodně amplifikovaných DNA fragmentů. Výhodou této techniky byl minimální požadavek na množství tkáňového vzorku, a dále bylo možné tyto vzorky skladovat za předepsaných podmínek po dlouhou dobu před jejich analýzou.

V tomto experimentu byly použity primery o velikosti 10, 20 a 30 bp libovolné sekvence umožňující dostatečně reprodučibilní amplifikaci DNA úseků, které jsou amplifikovány jako součást genomu všude tam, kde se vyskytují komplementární primerové sekvence. Po PCR reakci byly vzorky elektroforeticky rozděleny. Fragmenty identické velikosti, které se objevily u samic i samců, byly výsledkem buď amplifikace autozomálního lokusu, nebo Z specifického lokusu, který je společný oběma pohlavím. Druhý a méně častý typ vizualizovaných fragmentů tvořily bandy specifické pro heterogametické pohlaví, amplifikující W-unikátní lokusy. Další obdržené bandy odrážely amplifikované polymorfni lokusy.

Tato screeningová metoda je ovšem časově náročná, jelikož se „heterogametický“ band hledá za použití mnoha náhodně vybraných primerů. Dále se musí potvrdit, že se nejedná o band obdržený amplifikací polymorfniho lokusu, a to tak, že se daný primer, který lokus amplifikoval, použije v PCR reakci se vzorky DNA jedinců již stanoveného



pohlaví. Tato expertíza také vyžaduje modifikaci pro širší využití mezi ptačími druhy (Griffiths *et* Tiwari, 1993; Griffiths *et al.*, 1996).

V genotypu savců se nachází pro samce unikátní Y chromozom, který je tvořen převážně heterochromatinem, považuje se za nerekombinující, a jak se zdá, sdílí hodně znaků s ptačím W chromozomem. Na Y chromozomu byl identifikován SRY region, gen, který spouští vývoj samčího fenotypu (Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991). U ptáků nebyl nalezen žádný homolog tohoto genu a věřilo se, že W chromozom neobsahuje žádné kódující sekvence. K převratu došlo v roce 1996, kdy byl na W chromozomu objeven jako první a jediný gen CHD1 kódující Chromo-Helicase/ATPase-DNA binding protein 1. Do této doby neexistoval spolehlivější a časově méně náročný postup pro určení pohlaví u ptáků. Po identifikaci CHD1 genu, jehož výhodou je vysoký stupeň evoluční neměnnosti, se situace, která volala po objevení rychlé a vysoce spolehlivé metody, změnila, a bylo možné s určitostí stanovit pohlaví u ptáků, vyjma nadřádu běžců (Griffiths *et* Tiwari, 1993; Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996).

### **3. 5. 1 Historie objevu klíčového genu pro identifikaci pohlaví u ptáků**

Ptáky (Aves) lze pohlavně rozlišit podle absence (gonozomy samců ZZ), nebo přítomnosti (gonozomy samic WZ) pro samice unikátního W chromozomu. Je tedy logické, že pro přesné stanovení pohlaví zástupců třídy ptáků, musí být na W chromozomu identifikován W-specifický lokus/marker/gen (Griffiths *et al.*, 1992).

Poprvé se o identifikaci pohlaví u ptáků s použitím molekulárního přístupu pokusili Griffiths *et al.* (1992). Pro určení pohlaví u vybraných druhů ptáků byl zvolen W chromozom. PCR amplifikace genových lokusů s repetitivními DNA elementy tohoto chromozomu dokázala odhalit rozdíly mezi samičím a samčím pohlavím. Vědci tenkrát netušili, že amplifikovaný fragment společný samcům i samicím pochází ze Z chromozomu, stejného genu. Jelikož samice vykazovaly jeden extra band (800 bp), předpokládalo se, že tento lokus je spojený se vznikem samičího pohlaví.

Griffiths *et al.* (1996) objevili W-lokalizovaný gen a další identický gen, který, jak předpokládali, se buď nacházel na některém z autozomálních chromozomů nebo na gonozomu Z, analýzou DNA zástupců z řádů pěvci, hrabaví, dravci, srostloprstí, papoušci, sovy a dlouhokřídli. Navrhli tak všeobecně aplikovatelný na DNA založený systém pro identifikaci pohlaví.

Genomická DNA samic sýkory koňadry byla v tomto výzkumu podrobena restrikci a elektroforeticky rozdělena. Fragmenty o velikosti 9-23 kb byly vloženy do virového vektoru, který byl inkubován s hostitelským bakteriálním kmenem a následně podroben selekci na agarosovém gelu. Byla provedena DNA hybridizace za použití značených sond: DNA inzertu o velikosti 1,3 kb pocházejícího z CHD1W cDNA knihovny myši (*Mus musculus*) a 724- a 441bp inzertu jako PCR produktu pocházejícího od sýkory koňadry (*Parus major*). V další části tohoto experimentu byla provedena PCR amplifikace genomické DNA dalších druhů ptáků.

Autoradiografická analýza CHD1 sekvencí izolovaných z myši (*Mus musculus*), kura domácího (*Gallus domesticus*) a ary škraboškového (*Cyanopsitta spixii*) odhalila zásadní podobnost mezi těmito třemi druhy. Po elektroforetické separaci byly u samic rozpoznány bandy, které nebyly patrné u samců (CHD1W), naopak u obou pohlaví se objevily společné bandy, které jsou pravděpodobně výsledkem hybridizace sondy s CHD1 genem nelokalizovaným na W chromozomu. Pro porovnání homologních sekvencí cDNA pocházejících z myši, dvou genů z kura domácího a DNA klonu ary hyacintového (*Anodorhynchus hyacinthinus*) byly použity PCR primery P2 a P3 (Griffiths *et* Tiwari, 1995) amplifikující oba CHD1W i CHD1NW (na chromozomu W nelokalizovaný) geny.

Nejenom, že Griffiths *et al.* (1996) podali jasný důkaz pro existenci W-lokalizovaného i W-nelokalizovaného CHD1 genu, ale analýzou DNA zástupců dvou infratříd Neoaves a Eoaves dokázali, že CHD1W sekvence je evolučně vysoce stabilní a její lokalizace se předpokládá u všech druhů ptáků na W chromozomu.

Současně a nezávisle na objevu Griffithse *et al.* (1996) probíhal výzkum H. Ellegrena (1996). Také on došel k objevu W-lokalizovaného CHD1 genu a oběma pohlavími sdílenou kopii tohoto genu ovšem ne zcela identickou, která je autozomální nebo lokalizována na Z chromozomu. Byly prezentovány SSCP, RFLP analýzy a PCR amplifikace za použití primerů P2 a P3 (Griffiths *et* Tiwari, 1995). Obdržené amplifikované sekvence vykazovaly pozoruhodnou homologii, kromě 130bp a 175bp delecí, ke genu vyskytujícímu se u myši a kódujícímu chromo-helicase-DNA binding protein 1 (CHD1) (Delmas *et al.*, 1993). Přitom savčí a ptačí linie se oddělily před více než 200 milióny lety. To značí silnou evoluční zakonzervovanost tohoto genu. Co se nukleotidové sekvence týče, jedná se o 82,9%, u aminokyselinové sekvence 95,6% shodnost. Ellegren měl k dispozici DNA ptáků z řádů hrabaví, pěvci, vrubozobí, sovy, papoušci a pštrosi. RFLP analýza odhalila výjimku, kterou tvořil řád pštrosů. Separace

DNA fragmentů u pštrosů vykazovala jak u samců, tak samic stejný obraz (Ellegren, 1996).

Pštrosi reprezentují nejprimitivnější linii z dochovaných řádů ptáků, a společně s řádem tinamy patří do nadřádu běžci, u něhož byl zjištěn výskyt monomorfických pohlavních chromozomů (Takagi *et al.*, 1972); W chromozom je tvořen převážně euchromatinem a vykazuje značnou homologii v pruhování se Z chromozomem (Ansari *et al.*, 1988). To, že se CHD gen nevyskytuje u nadřádu běžců, může odrážet pozůstatky na teplotě závislého vývinu pohlaví (Deeming *et Ferguson*, 1991).

Griffiths *et Tiwari* (1996) popsali v patentu, jak lze CHD1 geny, lokalizované na W chromozomu a s velkou pravděpodobností také na Z chromozomu, využít pro diagnostiku pohlaví u ptáků. Výsledky publikované v této práci naznačují, že sonda GT-W, popsána autory již v roce 1993 (Griffiths *et Tiwari*, 1993), reprezentuje část intronu W-lokalizovaného genu. Vědcům se podařilo vyizolovat domnělý exon genu CHD1W, který takto pojmenovali podle vysoce shodné sekvence genu CHD1 identifikovaného u myši a podle lokalizace na W chromozomu. Aplikací CHD1W fragmentu jako hybridizační sondy na cDNA kura domácího odhalili sekvenci identickou s CHD1W fragmentem sýkory koňadry, ovšem nelokalizovanou na W chromozomu. Tento gen označili jako CHD-1A (A=avian).

Hypotézu lokalizace CHD-1A na Z chromozomu podporovala tato získaná data: hybridizace CHD-1A jako značené sondy s genomickou samčí DNA vykazovala daleko silnější signál (dvě kopie Z chromozomu) v porovnání s hybridizací samičí DNA obsahující pouze jednu kopii Z chromozomu. Dalším důkazem lokalizace CHD-1A na Z chromozomu je fakt, že gonozomy druhů patřících k nadtřídě běžců nejsou heteromorficky rozlišitelné, ale vykazují vysokou similaritu. To může znamenat, že mezi rozsáhlými částmi Z a W chromozomů nadále probíhá rekombinace, a že tyto regiony pravděpodobně zahrnují i CHD1 geny. Tato druhá hypotéza by vysvětlovala výsledky obdržené po elektroforetické separaci hybridizace CHD1-sondy s genomickou DNA samic a samců pštrosa, kdy byly vizualizované bandy u obou pohlaví shodné a žádný pohlavně specifický band nebyl rozpoznán.

Od doby, kdy byl poprvé izolován W-chromozom (Tone *et al.*, 1982) z genomu kura domácího, byla identifikována spousta W-lokalizovaných sekvencí (Griffiths *et Holland*, 1990; Griffiths *et Tiwari*, 1993). Ovšem všechny tyto DNA fragmenty vykazovaly charakter nekódujících repetit. Jak již bylo zmíněno, zásadní nevýhodou

těchto sekvencí, znesnadňující získání spolehlivých výsledků, je jejich vysoká rychlost, se kterou se vyvíjí, tedy mění.

Objevení genu CHD1W s vysokou evoluční stabilitou (funkční region CHD1W kura domácího a ary škraboškového vykazuje 96% shodnost, sekvence myšího CHD1 s CHD1W kura domácího je identická z 86 %) umožňuje využít hybridizační analýzy s CHD1W sondou pro determinaci pohlaví v rámci třídy ptáků. Pokud ale chceme prezentovat rozsáhlejší experiment vyúsťující v identifikaci pohlaví u ptáků, DNA hybridizace je metodou časově velmi náročnou a vyžadující nemalé finanční náklady. Daleko výhodnější metodou je PCR amplifikace za použití P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') a P3 (5'-AGATATTCCGGATCTGATA-3') primerů a následná restriční analýza (*Hae*III) PCR produktů. Restriční enzym je schopen štěpit amplifikovaný CHD-1A produkt, ale už neštěpí CHD1W PCR produkt. Tuto restriční analýzu je nutno provést, protože amplifikace CHD1W a CHD1Z sekvencí s použitím zmíněných primerů poskytovala produkty stejné velikosti, amplifikovala pouze exonové části genu.

Primery P2, P3 amplifikují vysoce zakonzervovaný úsek CHD1 genů, a jsou tedy pravděpodobně univerzálně využitelné ve třídě ptáků (*Aves*). Ačkoli sami autoři navrhuji pro spolehlivé stanovení pohlaví amplifikací genů CHD1W a CHD-1A nejprve provést validaci na několika jedincích nového druhu takto analyzovaného (Griffiths *et* Tiwari, 1995; Griffiths *et* Tiwari, 1996).

Závěrem tohoto patentu bylo vysloveno několik teorií popisujících mechanismy interakce genů CHD1W a CHD-1A. Tyto spekulace však v následujících letech nebyly potvrzeny.

1. CHD1W interaguje s jiným autozomálním nebo Z-lokalizovaným genem. Tato spolupráce určuje dózi genu. Nedostačující interakce (nepřítomnost CHD1W) vede ke vzniku samčího fenotypu naopak vysoká dóze genu spouští mechanismy vedoucí k vývoji samic.
2. Pokud se CHD-1A nachází na Z chromozomu, tak dvojnásobná dávka tohoto genu vyúsťuje ve vývoj samčího pohlaví. To by znamenalo, že geny CHD1W a CHD-1A nejsou srovnatelné, co se dózy genů týče. Jinými slovy, že exprese genů CHD1W a CHD-1A iniciuje vývoj samčího pohlaví, kdežto dvojitá dávka genu CHD-1A se projevuje vznikem samčího fenotypu.

3. Další možné vysvětlení by mohla nabízet teorie jednoduché dávky genu CHD-1A u samic. Role CHD1W genu, exprimovaného až po sexuální diferenciaci, by spočívala ve vyrovnání dávky funkčních proteinů.
4. Jestliže je CHD-1A lokalizován na autozomálních chromozomech, lze si představit, že dávka genů CHD1W a CHD-1A je na stejné úrovni a že u samic (AAW) je trojnásobná a vede k samičímu fenotypu, na rozdíl od samců (AA).

Předpokládá se, že CHD1 geny nejsou přímo zapojeny do vývoje a diferenciaci pohlaví u ptáků. Avšak tyto geny lze použít pro analýzu určení pohlaví u ptáků, jelikož geny CHD1 vykazují rozdíly v intronových sekvencích mezi CHD1Z a CHD1W. Jako ústřední geny zapojené ve vývoji a diferenciaci gonád u ptáků byly objeveny geny DMRT1 (Doublesex and Mab3-related transcription factor 1), FOXL2 (Forkhead box protein L2) a RSPO1 /WNT4 (R-spondin 1/Wingless-type MMTV integration site family, member 4) (Griffiths *et* Korn, 1997; Shetty *et al.*, 2002; Chue *et* Smith, 2011).

### **3. 5. 2 Lokalizace CHD1-A genu na Z chromozomu**

Griffiths *et* Korn (1997) potvrdili přítomnost druhého, na W chromozomu nelokalizovaného, CHD1 genu přítomného na gonozomu Z (CHD1Z). Jde o první případ, kdy byly objeveny dva homologní geny v rámci jednoho organismu.

Bylo zjištěno, že, na rozdíl od genů spojených s určením pohlaví u savců, které jsou charakteristické rychlou evoluční divergencí jak v sekvenci tak funkci, geny CHD1W a CHD1Z tuto vlastnost nevykazují, právě naopak. Produktem exprese CHD1 genů, je Chromo-Helicase/ATPase-DNA binding protein (CHD1). Jedná se o evolučně vysoce stabilní sekvenci s domnělou rolí v remodelaci chromatinové struktury.

Při identifikaci Z-lokalizovaného CHD1 genu vědci postupovali následovně: za použití DNA fragmentu, homologu CHD1, pocházejícího od sýkory koňadry, vyzolovali screeningovým přístupem asi 35 CHD1Z cDNA fragmentů (pocházejících z kuřecích embryí). Byla určena cDNA klonální sekvence a při porovnání aminokyselinové sekvence s mCHD1 proteinem byla stanovena 90,3% shodnost mezi těmito proteiny. Tato procentuální shodnost je dána výskytem hydrofilního úseku o velikosti 88 aminokyselin, který vzniká expresí CHD1Z genu, je bohatý na kyselinu glutamovou a lysin, a nebyl objeven u žádného z homologů u myši, drozofily ani u kvasinek. Funkce této 88aminokyselinové sekvence není zatím známa. Nukleotidová

sekvence tohoto regionu je charakteristická vysokým poměrem A/T nukleotidových bází (69%) ve srovnání s nukleotidovou sekvencí kódující ostatní domény tohoto proteinu (43%).

Pro lokalizování CHD1Z genu byla prezentována FISH analýza, která odhalila polohu tohoto genu: Zq1.2-1.3 (Griffiths *et* Korn, 1997).

### 3. 5. 3 Charakteristika CHD1W a CHD1Z genů a jejich produktů

CHD geny kódují CHD1 protein zapojený do kontroly exprese cílových genů a jeho funkci definují tři domény:

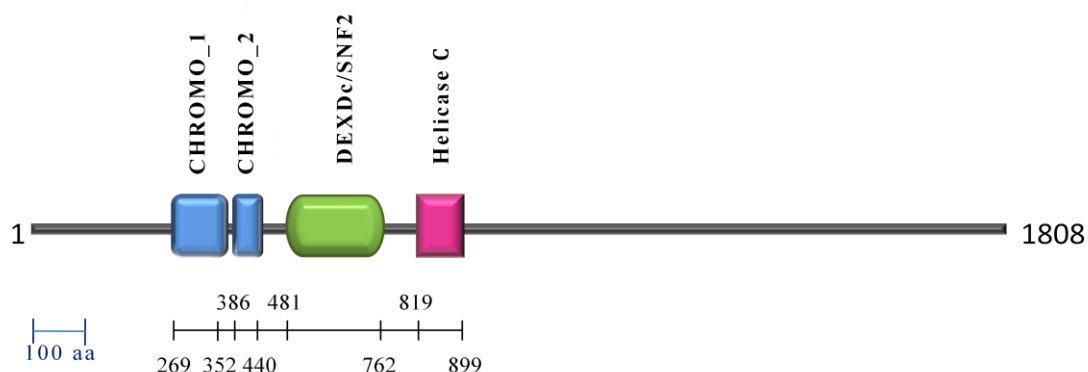
N-terminální CHROMO (CHRomatin Organization MOdifier) doména, jejíž aminokyselinová sekvence je velmi podobná proteinu HP1 (Heterochromatin protein 1), a formuje tak třetí třídu Polycomb (PcG) proteinů. Produkty Polycomb genů obecně hrají důležitou roli v procesu represe transkripce homeotických genů. Předpokládá se, že tyto proteiny jsou součástí rozsáhlejších proteinových komplexů. Efekt represe transkripce může být příčinou chromatinové komprese, jinými slovy, že PcG proteiny hrají ústřední roli v heterochromatinizaci DNA a regulují tak expresi cílových genů. CHROMO doména je tvořena vysoce zakonzervovanou sekvencí, která se kromě obratlovců také vyskytuje v genomu rostlin, hlístic a hmyzu (Griffiths *et* Korn, 1997; Databáze proteinových rodina domén: Pfam a Smart).

CHD1 geny kódují také doménu s helikázovou/ATPázovou aktivitou. Tato sekvence má nejbližší ke kvasinkám – SNF2/SWI2 a drozofile – Brahma geny – s rolí transkripčních aktivátorů díky účasti na chromatinové dekondenzaci. Jiné produkty genů s vysokou similaritou k CHD-helikázové doméně jsou využity při DNA reparaci a rozchodu chromatid při mitóze (Griffiths *et* Korn, 1997; Databáze proteinových rodina domén: Pfam a Smart).

Třetím motivem proteinu CHD1 je DNA-binding doména, která se preferenčně váže do míst DNA bohatých na A/T nukleotidové báze (Delmas *et al.*, 1993). Vazba je realizovaná díky „žlábků“ v předpokládané 3D struktuře proteinu (Griffiths *et* Korn, 1997; Databáze proteinových rodina domén: Pfam a Smart).

O struktuře CHD1W a CHD1Z genových produktů se zatím ví pouze málo. *In silico* přístup předpokládá přítomnost 3 (4) domén ve struktuře Chromo-helicase-DNA-binding proteinu 1 (Databáze proteinových rodina domén: Pfam a Smart) (Obr. 1).

## Chromo-helicase-DNA-binding protein 1 kódován CHD1Z



**Obr. 1: Struktura proteinu kódovaného CHD1Z genem.**

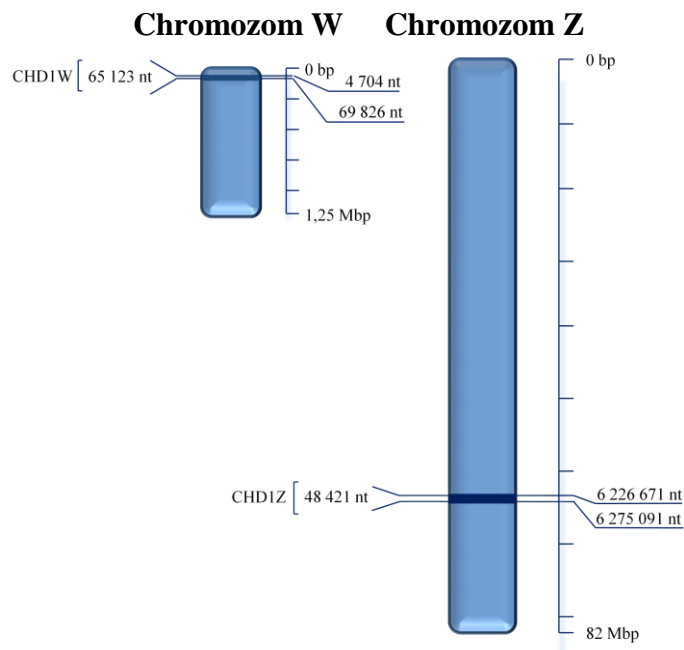
CHROMOdoména\_1 (269-352) a CHROMOdoména\_2 (386-440) jsou ve skutečnosti tzv. chromo shadow domény obsahující vysoce stabilní přibližně 60 aminokyselinový úsek. Tato doména je přímo zapojena v kondenzaci nukleozomů. Dochází tak k potlačení exprese cílových genů heterochromatinizací cílové DNA.

DEXDc/SNF2 (481-762) a Helicase doména (819-899) patří do skupiny DEA(D/H)-box RNA helikáz. Účastní se převážně rozvolnění dvouvláknové molekuly DNA. Helikázy jsou obecně zapojeny v procesu regulace transkripce, DNA reparace a DNA rekombinace.

Pozn. Schéma proteinu bylo převzato z databáze proteinových rodin a domén Smart: smart.embl.de (protein: O42142) a Pfam: pfam.sanger.ac.uk (protein: O42142), a modifikováno.

Pokud jde o nukleotidová složení CHD1Z a CHD1W genů, ta byla získána pomocí shotgun genomové sekvenční metody a bioinformatické analýzy. Chromozom W je velký přibližně 1,25 Mbp. Zatím byla zjištěna lokalizace 31 domnělých genů včetně CHD1W. Tento gen zabírá asi jednu dvacetinu chromozomu, tedy 65 kbp (Obr. 2). Chromozom Z je přibližně 66krát větší než chromozom W. Na chromozomu Z bylo identifikováno 825 domnělých genů. Gen CHD1 na tomto chromozomu zabírá asi 48 kbp (Obr. 2). Tato data ukazují odlišnou velikost mezi geny CHD1W a CHD1Z způsobenou různou velikostí intronových oblastí CHD1 genu. Exony genu CHD1 zahrnují sekvenci o velikosti asi 5000 nukleotidů. Rozdílné velikosti intronových oblastí mezi těmito geny se využívá v diagnostice pohlaví u ptáků.

(Tato fakta byla získána analýzou dat z NCBI genomové databáze (*Gallus gallus*), a, za použití Expasy, pBLAST, ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment, zpracována).



**Obr. 2: Schematické znázornění chromozomů W a Z a genů CHD1W a CHD1Z.**

Chromozom W. Gen CHD1W se nachází z rozmezí 4704-69826 nt. Celková velikost tohoto chromozomu byla zjištěna na 65 123 nt (National Centre for Biotechnology Information (NCBI), NW\_003766117.1 *Gallus gallus*).

Chromozom Z. Gen CHD1Z je lokalizován v rozmezí 6 226 671-6275091 nt. Jedná se o gen o velikosti 48 421 nt (National Centre for Biotechnology Information (NCBI), NC\_006127.3 *Gallus gallus*).

Pozn. Schéma bylo vytvořeno pomocí dat získaných z genomové databáze NCBI (*Gallus gallus*).

### 3. 6 Přehled na PCR založených metod určujících pohlaví u ptáků

#### 3. 6. 1 RFLP

Analýza polymorfismu restričních fragmentů RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) umožňuje detekci nukleotidových rozdílů mezi homologními DNA sekvencemi na základě přítomnosti fragmentů odlišné délky vznikající po restrikci speciálními restričními endonukleázami. Podstatou RFLP metody, která náleží k DNA fingerprintingovým metodám, je hybridizace značené DNA sondy s jedním nebo více fragmenty analyzované DNA (databáze NCBI, Probe).

RFLP analýza je velmi užitečným nástrojem k nalezení specifických markerů sloužících např. k identifikaci pohlaví u ptáků. McRae *et* Kovacs (1991) objevili multilokusovou sondu (33.15) sloužící k rozeznání pro pohlaví specifického fragmentu u čepcola hřebenatého (*Cystophora cristata*) a Jeffreys *et al.* (1987) a Rabenold *et al.*



(1991) úspěšně aplikovali tuto sondu pro určení pohlaví u myši a ptáků. Pro účel stanovení pohlaví u mláďat chaluhy jižní (*Catharacta antarctica*) byly nalezeny speciální restrikční fragmenty pomocí multilokusové minisatelitní sondy pV47-2 (Millar *et al.*, 1992).

U mnoha druhů ptáků lze stanovit pohlaví s využitím PCR amplifikace CHD1 genů s párem speciálně navržených primerů (Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996; Kahn *et al.*, 1998; Fridolfsson *et al.*, 1999), avšak u některých druhů ptáků se odlišné intronové oblasti daných genů s pomocí PCR amplifikace nedaří detekovat. Příkladem může být výzkum Han *et al.* (2009). Vědci se pokusili stanovit pohlaví u čápa východního (*Ciconia boyciana*) využívající „Griffithsovy“ primery, avšak marně. Proto bylo přistoupeno k RFLP analýze s využitím *HaeIII* restrikční endonukleázy. Samice vykazovaly dva produkty, kdežto samci jeden.

### **3. 6. 2 RAPD**

I RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analýzu lze aplikovat na určení pohlaví u ptáků. Tato metoda využívá speciálních RAPD markerů, které jsou produkovány pomocí PCR s náhodně zvolenými krátkými (10 bází) primery. K rozlišení samčího pohlaví od samičího se využívá amplifikace pro samice unikátní DNA sekvence lokalizované na W chromozomu. Je třeba zmínit, že spolehlivost této metody je v určitých situacích považována za diskutabilní (Hadrys *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1993). Ať už se jedná o nízkou reprodukovatelnost z důvodu citlivosti reakčních podmínek, nebo konkurenci mezi dvěma amplifikovanými produkty, při které může jeden zastínit druhý v přítomnosti slabého polymorfního produktu, nebo neschopnosti amplifikace v přítomnosti nulové alely, výzkum Lessels *et al.* (1998) a Huang *et al.* (2003) dokazuje, že lze RAPD analýzu využít pro identifikaci pohlaví u některých druhů ptáků.

### **3. 6. 3 Tandemové repetice**

DNA fingerprintingové metody jsou široce využívány ke stanovení genetické variability a příbuznosti mezi druhy (Geyer *et al.*, 1993). Analýzu vysoce polymorfních lokusů lze aplikovat i na identifikaci DNA sond umožňujících determinovat pohlaví (Longmire *et al.*, 1993).

Minisatelitové sekvence, a zvláště pak mikrosatelity, se nacházejí v genomech vyšších organismů ve velkém počtu. Toho lze využít k fingerprintingovým studiím

např. vyústujícím ve stanovení pohlaví. Minisatelity, tvořící krátké, do 40 bp dlouhé, tandemové repetice, byly aplikovány pro určení pohlaví u některých druhů ptáků, např. sonda M13 byla schopna rozlišit samce od samice u těchto druhů: poštolky mauricijské (*Falco punctatu*) a sokola stěhovavého (*F. peregrinus*) a sonda 33.15 u střízlíka venezuelského (*Campylorhynchus nuchalis*) (Longmire *et al.*, 1991; Rabenold *et al.*, 1991).

Mikrosatelity tvoří velmi krátké repetiční jednotky, do 6 bp. Už dříve bylo publikováno, že tyto repetice lze aplikovat na určení pohlaví, např. dinukleotidový (TG)<sub>n</sub> mikrosatelit byl nalezen u skotu (Kashi *et al.*, 1990), tetranukleotidová repetice (GACA)<sub>n</sub> byla schopna rozlišit pohlaví u některých dravců a trinukleotidová repetiční jednotka (TCC)<sub>n</sub> prokázala spojitost s determinací pohlaví u holubů a kura (Epplen *et al.*, 1991). Na základě těchto poznatků bylo přistoupeno k využití vysoce polymorfních jednoduchých repetic pro vývoj nových sond spojených s určením pohlaví u ptáků. Byly prověřeny tři typy dvounukleotidových sond (CT)<sub>n</sub>, (GT)<sub>n</sub> a (CG)<sub>n</sub>, a jedna trinukleotidová repetice (TCC)<sub>n</sub> u devíti ptačích druhů reprezentujících šest řádů (Longmire *et al.*, 1993).

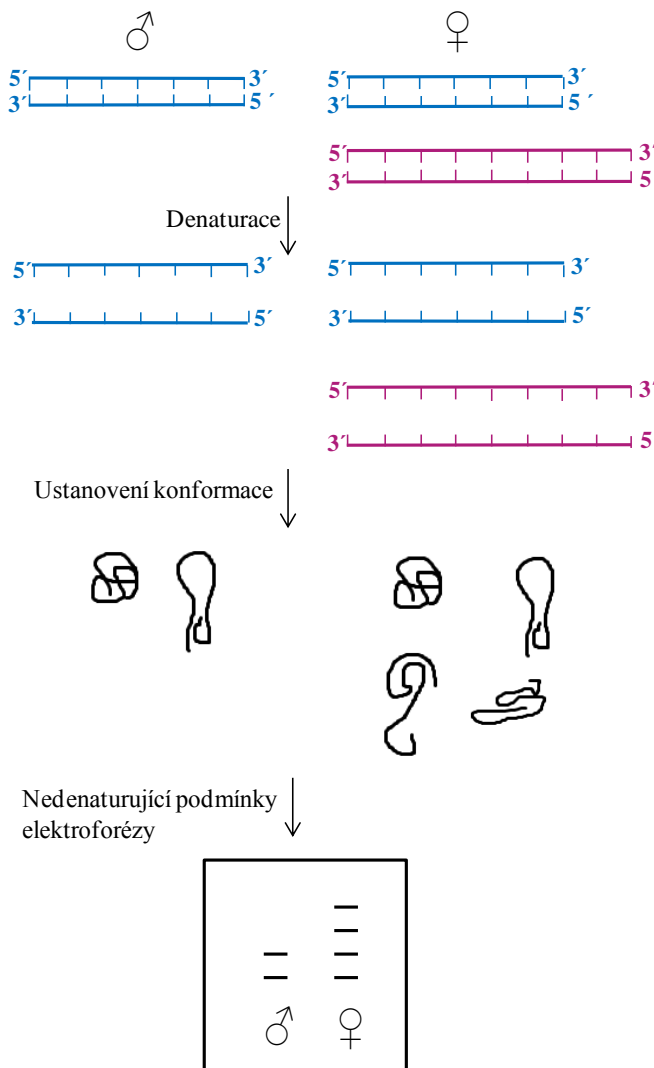
Pro studium pohlaví sokolovitých ptáků byly navrženy dva páry primerů amplifikující repetiční motivy (GT)<sub>12</sub> a (GT)<sub>11</sub>. Tyto polymorfní lokusy poskytovaly specifické produkty unikátní pro samice (Nesje *et Roed*, 2000).

#### 3. 6. 4 SSCP

Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) je s PCR spojená metoda odhalující genetickou variabilitu je velmi účinná při detekci nepatrných rozdílů, např. bodových mutací, mezi dvěma alelami (Ramos *et al.*, 2009). Ideální velikost amplikonu, při využití tohoto postupu, by měla být do 450-500 bp. Jedná se o metodu finančně nenáročnou, lze ji aplikovat na velké množství vzorků najednou (high-throughput) a je velmi užitečná při studiu široké škály patogenů a nemocí, s potenciálem uplatnění v rámci jakéhokoliv genu jakéhokoliv organismu. Optimalizaci této metody není třeba provádět pro každý typ sekvence nebo organismus (Gasser *et al.*, 2006), např. pro P2/P8 amplifikované části CHD1 genů u jestřába Cooperova (*Accipiter cooperii*) byla SSCP analýza optimalizována, poskytující jasně viditelné produkty v 12% polyakrylamidovém gelu, při 1% cross-linkingu a bez glycerolu (Ramos *et al.*, 2009).

Mobilita jednovláknové DNA v polyakrylamidovém gelu za nedenedaturujících podmínek je závislá na velikosti a 3D struktuře DNA vlákna. V roztoku zaujímají

jednovláknové molekuly DNA sekundární a terciární konformace díky párování bází v rámci nukleotidů individuálního vlákna. To, jakou konformační strukturu vlákno zaujme, závisí na délce vlákna, sekvenci, a lokalizaci a počtu míst párování. Je proto možné rozlišit i bodové mutace, jelikož mutované vlákno zaujímá odlišnou 3D strukturu než vlákno původní (Gasser *et al.*, 2006). Výhody této vysoce senzitivní metody lze aplikovat i na identifikaci pohlaví u ptáků (Ramos *et al.*, 2009) (Obr. 3).



**Obr. 3: Schéma SSCP pro CHD1Z (modrá) a CHD1W (fialová).**

DNA vlákna se po PCR amplifikaci denaturují, následně se ustanoví 3D konformační struktura. DNA vlákna pocházející z amplifikace CHD1Z se objeví u samců (ZZ) i samic (ZW). U samic se budou navíc vyskytovat dvě konformační struktury pocházející z amplifikace CHD1W genu. Tato vlákna lze vizualizovat pomocí elektroforézy za nedenaturujících podmínek.

### 3.7 PCR amplifikace intronové oblasti CHD1 genů

#### RGss1/RGss2

Sada primerů RGss1/RGss2 byla navržena Griffiths *et Tiwari* (1992). Protože samice ptáků jsou pohlaví heterogametického, autoři hledali W-specifický lokus na

tomto unikátním chromozomu, který by se vyskytoval mimo pseudoautozomální region. Avšak v této době ještě nebyly na ptačích pohlavních chromozomech objeveny CHD1 geny, a tak se vědci pokusili o amplifikaci repetitivního DNA elementu s využitím PCR a speciálně navržených primerů. Tyto primery RGss1 (5'-CTGTCCTGCCACTTCCCAGCACT-3') a RGss2 (5'-CGGTCGGGAGGTTT-CAAGGAATG-3') amplifikovaly u samčích i samičích jedinců 175bp úsek. U samic se vyskytoval jeden „artificiální“ nadpočetný produkt o velikosti 800 bp. Vědci se správně domnívali, že tento produkt demonstroval s pohlavím spojený lokus. Tento experiment byl proveden s DNA špačka obecného (*Sturnus vulgaris*), u fylogeneticky vzdálenějších druhů, u kavky obecné (*Corvus monedula*) a sýkory koňadry (*Parus major*), se nepodařilo s využitím těchto primerů amplifikovat žádný s pohlavím spojený lokus. V současné době je už jasné, že primery RGss1 a RGss2 amplifikovaly intronovou sekvenci CHD1 genů na Z a W chromozomech (Dvořák *et al.*, 1992; Griffiths *et al.*, 1992).

### **P3/P2**

Griffiths *et Tiwari* (1993) popsali postup izolace pro pohlaví specifických genetických markerů a tuto metodu aplikovali na identifikaci vysoce evolučně/geneticky stabilního genu (C-W), který, jak předpokládali, byl situován na W chromozomu u všech druhů ptáků vyjma primitivního nadřádu běžců (Griffiths *et Tiwari*, 1995). Dále předpokládali lokalizaci ještě jednoho k tomuto genu blízké příbuzného genu (C-2) v rámci genomu. Z genomové knihovny (DNA pocházející od ary hyacintového) byla vyizolována sekvence C-W a následně byly navrženy primery, P3 forward (5'-AGATATTCCGGATC-TGATAGTGA-3') a P2 reverse (5'-TCTGCA-TCGCTAAATCCAAA-3'), amplifikující 104bp sekvenci pocházející od obou C-W a C-2 genů. Sekvenční analýza v rámci C-W odhalila přítomnost specifického restrikčního místa, které chybělo u sekvence C-2, a tak mohla být provedena restrikce, která následně umožnila rozlišit samčí a samičí produkty.

Griffiths *et Tiwari* (1996) aplikovali tyto primery na určení pohlaví u různých ptačích druhů.

### **P2/P8**

Kombinace primerů P2 a P8 pro PCR amplifikaci dvou ptačích CHD1 genů nabízí spolehlivé určení jejich pohlaví (neplatí pro nadřád běžci). Tento postup nevyžaduje

aplikaci restriktivního enzymu, tak jak tomu bylo při použití P3 a P2 primerů (Griffiths *et Tiwari*, 1995). PCR primery nasedají na teplátovou DNA v místě exonické evolučně vysoce zakonzervované sekvence, avšak amplifikují i intronovou část daného CHD1 genu. Tato nekódující sekvence se naopak v průběhu evoluce nečasto mění a mezi geny CHD1W a CHD1Z se často liší, proto i PCR produkty těchto genů mají rozdílnou velikost a lze je elektroforeticky rozlišit: u samičích jedinců lze identifikovat dva bandy, extra band odpovídá amplifikaci CHD1W a je o asi 50 bp větší, u samčích jedinců se objevuje pouze jeden band (Griffiths *et al.*, 1998).

Primery P3 a P2 (Griffiths *et Tiwari*, 1995) amplifikované sekvence byly porovnány v rámci myšího CHD1 a ptačího CHD1Z genu. Tento postup sloužil jako základ pro nalezení intronových částí CHD1 genu a navržení nového forward primeru P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') (Griffiths *et al.*, 1998).

P2/P8 primery byly použity pro předběžné určení pohlaví u bažanta mandžuského (*Crossoptilon mantchuricum*) (Wang *et Zhang*, 2009). Amplifikované produkty o velikosti 300 bp a 400 bp byly extrahovány a podrobeny sekvenaci. Vědci takto mohli navrhnout nový pár primerů sex1 (5'-CTCCCAAGGATGAGAACTGTGCAA-AACAGGTA-3') a sex2 (5'-CCTTCACTTCCATTAAAGCTGATCTGGAATTTC-3'), které vykazovaly komplementární sekvenci s oblastí konzervativní domény v rámci CHD1 genů. Proběhla optimalizace PCR podmínek a výsledky ukázaly 100% úspěšnost při použití sex1/sex2 primerů u bažanta mandžuského a jiných druhů z řádu hrabaví v porovnání se 91,01 % při použití P8/P2 primerů. Účinnost sex1/sex2 setu primerů byla ověřena i pro některé ptáky z řádu pěvců. Tyto výsledky navrhuji aplikaci těchto primerů pro širší využití ve třídě ptáků.

### **1237L/1272H**

Tyto primery nasedající na evolučně neměnné exonové sekvence a amplifikující téměř výhradně intronový úsek CHD1 genů na W a Z chromozomech byly navrženy pro potřeby určení pohlaví v rámci těchto řádů: vrubozobí, hrabaví, pštrosi a dlouhokřídlí (Kahn *et al.*, 1998). Jelikož introny CHD1 genů vykazují vysokou variabilitu, i PCR produkty amplifikované těmito nově navrženými primery 1237L (5'-GAGA-AACTGTGTGCAAAACAG-3') a 1272H (5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3') se liší velikostí produktů mezi geny CHD1W a CHD1Z (v rozmezí od 210 do 285 bp). U samičích jedinců, kde PCR amplifikace poskytovala dva produkty o různých

velikostech, se vyskytoval, v porovnání se samci, jeden produkt stejné velikosti a druhý produkt byl často výsledkem amplifikace delšího úseku DNA. Tyto rozdíly mohly být způsobeny vznikem delecí v průběhu evoluce v rámci Z chromozomu nebo inzercí na W chromozomu. I u druhů, u kterých se vyskytovaly pouze nepatrné rozdíly mezi intronovými sekvencemi, bylo možné rozlišit pro samice specifický band. V případně výskytu stejně dlouhých produktů, byla u některých vzorků použita metoda SSCP.

### **2550F/2718R**

Ani postup popsáný Fridolfsson *et* Ellegren (1999) a využívající 2550F/2718R primery není výjimkou a je založen na detekci rozdílné velikosti amplifikovaných intronových sekvencí mezi geny CHD1W a CHD1Z. Tyto geny, jak již bylo mnohokrát zmíněno, vykazují vysoký stupeň sekvenční konzervovanosti jak mezi geny samotnými tak v porovnání se savčími homology. Primery 2550F/2718R byly aplikovány na určení pohlaví u 50 druhů ptáků reprezentující 11 řádů a u 47 bylo určení pohlaví úspěšné. Set těchto primerů byl navržen s využitím již dostupných cDNA sekvencí (*Gallus gallus*) tak, aby amplifikoval genomickou DNA a odhalil, při porovnání sekvencí, intronové oblasti. Primery 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') a 2718R (5'-ATTA-AATGATCCAGT-GCTTG-3') amplifikovaly úseky o velikosti 450 bp (CHD1W) a 600 bp (CHD1Z). U zbývajících tří druhů patřících do řádu pěvci byly použity primery 2987F/3112R u jednoho druhu a u dalších dvou primery 3007/3112R (Ellegren *et* Fridolfsson, 1997) s výsledkem úspěšného stanovení pohlaví.

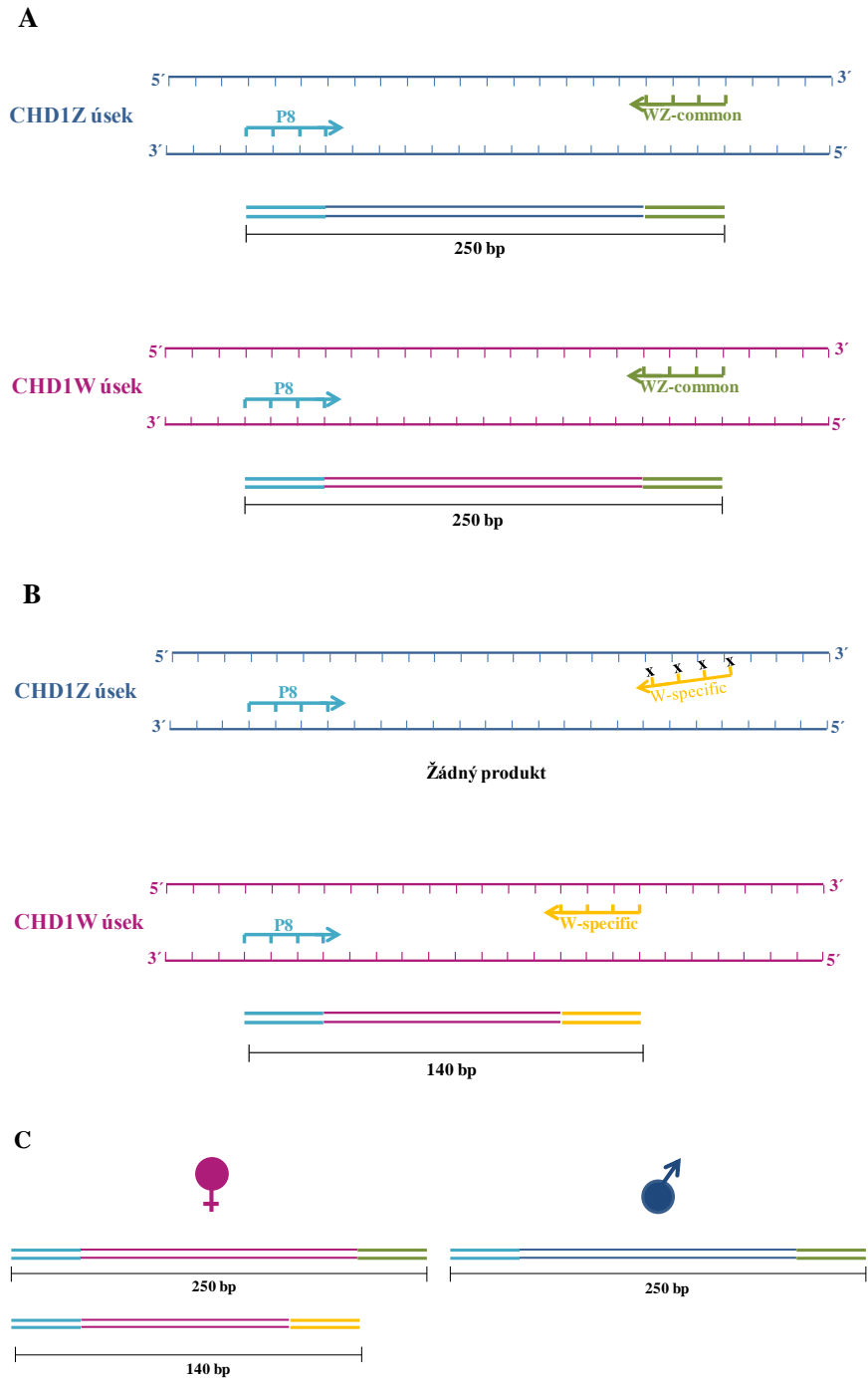
Kombinací sad primerů 1237L/1272H (Kahn *et al.*, 1998) a 2550F/2718R (Fridolfsson *et* Ellegren, 1999) mohlo být určeno pohlaví u 73 ptačích druhů ze 17 čeledí (Wang *et al.*, 2007). Vědci tento postup nazvali dvouintronová determinace pohlaví. U 49 druhů fungovaly oba sady primerů, u zbývajících druhů amplifikovala buď první sada, nebo druhá. Vědci vyhodnotili intron 1237L/1272H jako nejspolehlivější pro identifikaci pohlaví, amplifikace byla úspěšná u 78,75 % analyzovaných druhů.

### **P8, W-common a WZ-specific**

Jelikož geny CHD1W a CHD1Z vykazují rozdílnou délku intronových úseků, je možné navrhnout speciální primery pro amplifikaci těchto úseků a stanovit tak pohlaví u ptáků. Avšak často se lze setkat se sadou primerů, která není schopna amplifikovat

nebo od sebe rozlišit CHD1 geny, většinou z důvodu vzdálenější fylogenetické příbuznosti. Proto tato metoda vyžaduje nalézání nových primerů, které lze aplikovat na konkrétní čeledě, popř. samostatné druhy (Ellegren 1996; Ellegren *et Sheldon*, 1997; Griffiths *et al.*, 1998; Wang *et Zhang*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

Ani u druhu volavky žlutozobé se nepodařilo obdržet spolehlivé výsledky stanovující pohlaví s využitím primerů P8/P2. Vědci zjistili, že důvodem byl intronový polymorfismus genu CHD1Z, který do té doby nebyl u volavkovitých ptáků zaznamenán. Aby mohlo být u těchto druhů identifikováno pohlaví, byly navrženy nové primery WZ-common a W-specific (Wang *et al.*, 2010). Experiment byl proveden u 10 druhů ptáků z čeledi volavkovití: volavka žlutozobá (*Egretta eulophotes*), volavka stříbřitá (*E. garzetta*), volavka pobřežní (*E. sacra*), volavka bílá (*Ardea alba*), volavka popelavá (*A. cinerea*), volavka čínská (*Ardeola bacchus*), volavka rusohlavá (*Bubulcus ibis*), kvakoš noční (*Nycticorax nycticorax*), bukáček skořicový (*Ixobrychus cinnamomeus*) a bukáček žlutohý (*I. sinensis*). K obdržení CHD1 sekvencí byly geny amplifikovány P8/P2 primery, produkty byly elektroforeticky rozděleny, DNA byla vyizolována a klonována. Sekvence těchto klonů odhalila vysoce homologní části na W a Z chromozomech. Ovšem u Z chromozomu byly objeveny úseky, které vykazovaly deleční vlastnosti. Proto mohly být navrženy reverzní primery WZ-common (5'-CCCTTCACTTCCATTAAAGC-3') amplifikující stejné zakonzervované oblasti Z genu i W, a W-specific (5'-ACCCAACCCAAAA-GTACAAG-3') amplifikující pouze W-specifický úsek. Jako forward primer byl použit P8 (Griffiths *et al.*, 1998) (Obr. 4).



**Obr. 4: Schéma PCR amplifikace s využitím primerů P8/WZ-common/W-specific.**

A. Znázornění P8/WZ-common amplifikace genů CHD1Z a CHD1W. Produkty jsou stejně dlouhé, asi 250 bp. B. Zobrazení amplifikace genu CHD1W sadou primerů P8/W-specific. Poněvadž se komplementární sekvence k primeru W-specific vyskytuje pouze na CHD1W genu, produkt vzniká jen u samic. C. Elektroforetická separace umožňuje zobrazit PCR amplifikační produkty. U samic se nacházejí dva bandy odpovídající velikostem 250 a 140 bp, u samců pouze band o velikosti 250 bp.



## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

---

Vzorky DNA byly získány od ptáků pocházejících ze zoologických zahrad, nebo z přírody. Jedná se jak o vzorky krve, tak vzorky tkáňové. Izolace genomové DNA pro potřeby PCR byla provedena podle postupu uvedený v Maniatis *et al.* (1982) a upravena pro materiální a technické podmínky naší laboratoře.

### 4.2 Fenol-chloroformová izolace genomové DNA

---

1. Krev byla uchovávána v Queen's pufu (Seutin *et al.*, 1991). Do 1,5ml mikrozkušavky bylo napipetováno 500  $\mu$ l tohoto roztoku. V případě izolace DNA z tkáně, byl do mikrozkušavky vložen kousek tkáně o velikosti hrášku. Tkáň většinou pocházela z mozku, prsního svalu nebo jater. Mikrozkušavky s tkáňovými vzorky byly podrobeny homogenizaci mikrohomogenizátorem. Bylo přidáno 400  $\mu$ l Queen's pufu (Seutin *et al.*, 1991). Další postup se již pro krevní i tkáňové vzorky shodoval.
2. Do každé mikrozkušavky bylo připipetováno 100  $\mu$ l roztoku proteinázy K (10 mg/ml), následovalo promíchání překlápěním a přidání 100  $\mu$ l 10% roztoku SDS.
3. Takto připravené mikrozkušavky byly inkubovány přes noc za překlápění při 37 °C v termostatu.
4. Po asi 12h inkubaci bylo ke směsi přidáno 400  $\mu$ l fenolu a 400  $\mu$ l chloroformu. Mikrozkušavky byly zvortexovány a zcentrifugovány (2000 g/5 min). Po centrifugaci byla odebrána do nové mikrozkušavky vrchní fáze pomocí pipety se zastřiženou špičkou tak, aby nedošlo k nasátí fenolu a chloroformu.
5. K odebranému vzorku bylo přidáno 700  $\mu$ l chloroformu. Mikrozkušavky byly zvortexovány a zcentrifugovány (2000 g/5 min). Po centrifugaci byla odebrána vrchní fáze do nové mikrozkušavky tak, aby nedošlo k nasátí bílého zákalu proteinů. Tento krok byl ještě jednou zopakován.
6. K odebranému roztoku bylo přidáno 180  $\mu$ l vychlazeného octanu sodného (3 mol/l) a následně byly mikrozkušavky vyplněny vychlazeným 96%

etanolem. Mikrozkušavky byly promíchány překlápěním a uloženy na 2 h do 20 °C.

7. Mikrozkušavky byly po 2h inkubaci centrifugovány při 13000 g po dobu 30-40 min.
8. Ethanol byl slit tak, aby nedošlo k vyjmutí sraženiny DNA. Byl připipetován 1 ml vychlazeného 1% etanolu.
9. Mikrozkušavky byly centrifugovány při 13000 g po dobu 10 min.
10. Ethanol byl opět slit/odpipetován tak, aby nedošlo k vyjmutí sraženiny DNA. Následoval proces sušení v termobloku nebo v koncentrátoru DNA.
11. Jakmile byla DNA vysušená, bylo připipetováno 500 µl TE pufru.
12. DNA byla rozpouštěna za překlápění v termostatu asi 12 h (přes noc) při 40 °C. Pro lepší rozpuštění DNA byla na několik desítek minut zvýšena teplota na 60 °C.
13. Koncentrace DNA byla změřena pomocí fluorometru. Mikrozkušavky s vyizolovanou DNA byly zamrazeny při -20 °C. Pro opětovné použití roztoků DNA musel být vždy zopakován krok 12., aby byla DNA dobře rozpuštěná.
14. Po rozpuštění DNA byla DNA naředěna deionizovanou vodou na potřebnou koncentraci a skladována při 4 °C.

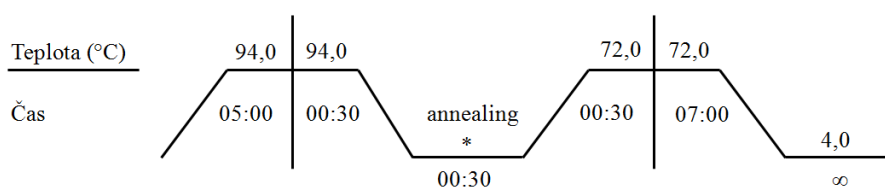
### **4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

---

Polymerázová řetězová reakce byla použita k amplifikaci intronových úseků genů CHD1Z a CHD1W pro stanovení pohlaví u vybraných druhů ptáků. Pro jeden typ amplifikace byly aplikovány primery P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCAAA-3') (Griffiths *et Tiwari*, 1995) a P8 (5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3') (Griffiths *et al.*, 1998), u druhého typu byly použity primery P8, WZ-common (5'-CCCTTCAC-TTCCATTAAAGC-3') a W-specific (5'-ACCCAACCCAAAAGTACAAG-3') (Wang *et al.*, 2010). Každá PCR reakce obsahovala 1 µl templátové DNA o koncentraci 50 µg/ml a 9 µl PCR mixu (Tab. I). Podmínky PCR reakce pro 10 µl finálního roztoku jsou uvedeny ve Schématu 1.

**Tab. I: Složení PCR mixu pro šest PCR reakcí.**

Komponenty PCR mixu	Koncentrace zásobního roztoku	Objem roztoku (μl)	
		P2/P8 v reakci	P8/WZ/W v reakci
Deionizovaná voda		44,4	41,1
Storage buffer	10x	6,7	6,7
MgCl <sub>2</sub>	25 nmol/l	4	4
dNTP	100 μmol/l	0,7	0,7
Primer P2	10 μmol/l	3,3	x
Primer P8	10 μmol/l	3,3	3,3
Primer WZ-common	10 μmol/l	x	3,3
Primer W-specific	10 μmol/l	x	3,3
<i>aTaq</i> DNA Polymeráza	1 U/μl	1	1

**Schéma 1: Podmínky PCR reakce.**

\* Teplota annealingu různá v závislosti na ptačím druhu.

#### 4. 4 Elektroforetické dělení PCR produktů

Před zahájením elektroforetického dělení PCR produktů musela být připravena elektroforetická skla s polyakrylamidovým gelem. Následující postup byl proveden v digestoři:

1. Elektroforetická skla byla na ploše dotyku s gelem řádně odmaštěna detergentním přípravkem a následně 3x očištěna 96% etanolem a osušena pomocí papírových ručníků.
2. Na větší sklo byl aplikován přípravek pro odpuzování vody z oken automobilů. Po pěti minutách bylo sklo opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno.
3. Na menší sklo byl na celou plochu aplikován roztok 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% etanolu se 3 μl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Po

pětiminutovém zaschnutí byl povrch skla 4x omyt 96% etanolem a osušen. Tento roztok zajistil přilepení polyakrylamidového gelu k povrchu skla.

4. Na okraje většího skla byly položeny 0,4 mm silné spacery a na toto sklo bylo položeno menší sklo, ošetřenými plochami k sobě.
5. Polyakrylamidový gel byl připraven smísením 60 ml 6% roztoku akrylamid:N, N'-metylenbisakrylamid v poměru 19:1, 40  $\mu$ l N, N, N', N'-tetrametyletylendiaminu a 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného. Takto připravený roztok byl postupně vléván mezi skla, až vyplnil celý prostor mezi skly. Do horního okraje gelu byl vložen hřebínek rovnou stranou do gelu tak, aby vytvořil hranu pro pozdější zavedení hřebínku. Skla byla zajištěna proti pohybu pomocí klips. Gel polymerizoval asi 60 minut.

Elektroforetické rozdělení PCR produktů:

6. Po utuhnutí gelu byla skla ze stran očištěna vodou od zbytků gelu a vložena do elektroforetické komůrky, upevněna a zalita 0,5 x TBE pufrům.
7. Hřebík byl z gelu vyjmut a prostor nad hranou gelu vyčištěn od zbytků gelu a močoviny pomocí proudu pufru z injekční stříkačky.
8. Následovalo třicetiminutové nahřívání gelu. Zdroj stejnosměrného elektrického proudu pro elektroforézu byl nastaven na výkon 90 W, napětí 3000 V a proud 150 mA.
9. Po přehřátí gelu byl prostor nad hranou gelu mezi skly opět vyčištěn. Hřebínek byl zasunut asi 1 mm hluboko do gelu.
10. K PCR produktu bylo přidáno 5  $\mu$ l nanášecího pufru. PCR produktová směs byla vložena na 3 minuty do termobloku vytemperovaného na 96 °C. Poté byly mikrozkušavky ihned vloženy na ledovou tříšť, aby DNA nezrenaturovala.
11. Takto připravené vzorky byly naneseny do gelu pomocí osmikanálové pipety, která proces značně urychlila. Byl nanášen objem v rozmezí od 1  $\mu$ l až 3  $\mu$ l.
12. Po nanesení vzorků byl katodový i anodový prostor uzavřen a elektroforetická komůrka opět připojena ke zdroji proudu. Pro elektroforetické rozdělení molekul DNA v gelu byl nastaven výkon 70 W, napětí a proud zůstaly na maximálních hodnotách.
13. Délka elektroforetického dělení závisela na velikosti DNA molekul, tedy na molekulové hmotnosti, která se od druhu lišila. Obvyklá doba separace byla 1,5 h, u některých vzorků až 4 h.

Příprava roztoků pro vizualizaci elektroforeticky rozdělených DNA molekul:

14. V průběhu elektroforetického dělení PCR produktů byly připraveny následující roztoky: 800 ml 10% kyseliny octové, tzv. FIX/STOP roztok, 800 ml 1%  $\text{HNO}_3$ , 800 ml 0,1% roztoku  $\text{AgNO}_3$ , do kterého bylo těsně před použitím přidáno 1,2 ml formaldehydu, a 800 ml 3% roztoku  $\text{NaCO}_3$  (vývojka), do kterého bylo těsně před použitím napipetováno 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu\text{l}$  1% roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Roztok vývojky byl vložen do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než 10 °C.

Zacházení s gelem po elektroforetickém rozdělení PCR produktů:

15. Po vypnutí elektrického zdroje a odpojení elektrod, byla skla s gelem vyjmuta z elektroforetické komůrky a umístěna na rovnou plochu, podestu z polystyrénu. Z boků skel byly odstraněny spacery a skla byla od sebe pomocí nože odlepena tak, že polyakrylamidový gel zůstal přilepen na menším skle.
16. Menší sklo s gelem bylo vloženo do fotomisky a umístěno na třepačku, stabilně umístěnou v digestoři. Byl přidán FIX/STOP roztok.
17. Po 20 minutách působení FIX/STOP roztoku, byl tento roztok slit do plastové baňky a gel byl 3x 2 minuty propláchnut deionizovanou vodou.
18. V dalším kroku na gel působil roztok 1%  $\text{HNO}_3$  po dobu 5 minut. Po době působení byl roztok vylit do výlevky a gel byl 3x 2 minuty propláchnut deionizovanou vodou.
19. Sklo s gelem bylo umístěno do fotomisky určené pro působení roztoku 0,1%  $\text{AgNO}_3$ . Roztok dusičnanu stříbrného působil na gel asi 30 minut.
20. Po uplynutí 30 minut, byl roztok 0,1%  $\text{AgNO}_3$  slit zpět do láhve, gel byl na 5 vteřin ponořen do deionizované vody, rychle vytažen, umístěn do fotomisky určené pro vyvíjení a zalit vývojkou.
21. Vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených bandů PCR produktů trvalo asi 2 minuty. Poté byl roztok zalit FIX/STOP roztokem, který zastavil reakci vyvíjení. Doba působení FIX/STOP roztoku byla asi 2 minuty.
22. Následně bylo sklo s gelem opláchnuto v deionizované vodě a po okapání vloženo do sušárny (90 °C) asi na 45 minut.
23. Skla s gelem byla hodnocena na negatoskopu. K archivaci výsledků sloužily oskenované obrázky skel.

## 4. 5 Chemikálie a zásobní roztoky

---

### 4. 5. 1 Chemikálie

- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Akrylamid (AppliChem)
- *aTaq* Polymeráza (5U/ $\mu$ l) (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná H<sub>2</sub>O (AQUA OSMOTIC pro laboratorní vodu)
- dNTPs (100 mmol/l) (Promega)
- Dusičnan stříbrný AgNO<sub>3</sub> (Lachema)
- Etanol (96%) (Lihovar Vrbátky)
- Formaldehyd (Lachema)
- Glycerol
- Chlorid hořečnatý MgCl<sub>2</sub> (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná HNO<sub>3</sub> (65%) (Lachema)
- Kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA) (Lachema)
- Ledová kyselina octová (Lachema)
- Močovina (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO (Lachema)
- N, N, N', N' - tetrametyletylendiamin (Serva)
- N, N' - metylenbisakrylamid (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>
- Rain-X odpuzovač vody ze skel automobilů
- Thiosíran sodný Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v H<sub>2</sub>O (1%) (Lachema)
- Tris (AppliChem)
- Uhličitan sodný Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Lachema)
- Xylénová modř (AppliChem)

### 4. 5. 2 Příprava roztoků

100ml zásobní roztok 0,5% kyseliny octové v 96% etanolu

- 0,5 ml ledové kyseliny octové a 99,5 ml 96% etanolu

Zásobní 40% roztok akrylamidu : N, N' - metylenbisakrylamidu v poměru 19 : 1

- 380 g akrylamidu

- 20 g N, N' - metylenbisakrylamidu

Tyto dvě komponenty byly rozpuštěny v 500 ml deionizované H<sub>2</sub>O. Poté byl objem doplněn na 1 l. Roztok byl uchováván v temné lahvi obalené alobalovou fólií.

#### Zásobní roztok 6% akrylamidu

- 420 g močoviny
  - 484 ml deionizované H<sub>2</sub>O
  - 50 ml 10x TBE
  - 150 ml 40% roztoku akrylamidu : N, N' - metylenbisakrylamidu, 19 : 1
- Všechny složky byly řádně rozpuštěny, roztok byl přefiltrován a uložen v temné lahvi obalené alobalovou fólií.

#### 10% roztok peroxodisíranu amonného

- 5 g peroxodisíranu amonného bylo rozpuštěno v 50 ml deionizované H<sub>2</sub>O
- Roztok byl uchováván v 50ml falkonkách v lednici při 4°C.

#### 10x TBE pufr

- 108 g Tris báze
- 55 g kyseliny borité
- 7,5 g EDTA

Složky byly doplněny na objem 1 l deionizovanou H<sub>2</sub>O.

#### Pracovní roztok 1x TBE

- 250 ml 10x TBE bylo doplněno na objem 5 l.

#### FIX/STOP roztok

- 80 ml ledové kyseliny octové doplnit deionizovanou H<sub>2</sub>O na objem 800 ml.

#### 1% roztok HNO<sub>3</sub>

- 12 ml 65% HNO<sub>3</sub> bylo doplněno deionizovanou H<sub>2</sub>O na objem 800 ml.

#### 0,1% roztok AgNO<sub>3</sub>

- 0,8 g AgNO<sub>3</sub> bylo doplněno na objem 800 ml deionizovanou H<sub>2</sub>O.

Vývojka

- 24 g NaCO<sub>3</sub> bylo doplněno na objem 800 ml deionizovanou H<sub>2</sub>O.

Nanášecí pufr pro polyakrylamidovou elektroforézu

- 5 g bromfenolové modři
- 30 ml glycerolu

Komponenty byly doplněny na objem 800 ml deionizovanou H<sub>2</sub>O.

#### **4. 6 Přístrojové vybavení laboratoře**

---

Denaturační termocycler MJ Research, Inc., PTC-100™

Elektroforéza MODEL 32, BIOMETRA, Life Technologies™

Finnpipette® pipety, kapacita: 100-1000 µl

0,2-2 µl

10-100 µl

1-10 µl

osmikanálová 1-10 µl

Hybridizační pec HB-2D, HYBRIDISER TECHNE

Chladnička kombinovaná, Whirlpool

Mikrocentrifuga, Cleaver Scientific Ltd.

Minitřepačka MS2, Minishaker IKA®

Negatoskop, MANEKO

Přístroj na tvorbu ledové tříště Icematic F100 Compact, Castel Mac

Přístroj na výrobu deionizované vody, typ 02 (laboratorní voda)

AQUAOSMOTIC

Sušárna se sterilizátorem CAT 8050, Contherm Scientific, Ltd.

Thermocycler BIOER, GenePro

Třepačka ORBIT 1900, Labnet International

Váha Bel Engineering (setiny gramu)

Zdroj napětí EV232, Consort



#### **4. 7 Ostatní vybavení laboratoře**

---

Čistící kartáč  
Falkonky  
Fotomisky  
Hřebínek  
Injekční stříkačka (50 ml)  
Kádinky  
Nůž  
Odměrné válce  
Papírové utěrky  
PCR tenkostěnné zkumavky po osmi ve stripu  
Pipetové špičky  
Plastové baňky typu Erlenmeyer  
Spacery  
Stojánky na PCR stripy  
Stojánky na zkumavky typu Eppendorf (1,5 ml)  
Zásobní laboratorní láhve  
Zkumavky typu Eppendorf (1,5 ml)

#### **4. 8 Tvorba obrázků, schématu a tabulek**

---

- K tvorbě tabulek byl využit program Microsoft Office Word 2007.
- K tvorbě schématu byl využit program Microsoft PowerPoint 2007.
- K vytvoření a zpracování obrázků byly využity online dostupné bioinformatické nástroje: ExPASy, pBLAST a ClustalW. Dále byly využity programy Microsoft PowerPoint a GIMP2.

## **5 VÝSLEDKY**





























## **6 DISKUZE**













## **7 ZÁVĚR**

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

**Ansari H. A., Takagi N., Sasaki M.** (1988): Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenetics and Cell Genetics* 47: 185-188.

**Berlin S., Ellegren H.** (2004): Chicken W: A genetically uniform chromosome in a highly variable genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15967-15969.

**Deeming D. C., Ferguson M. W. J.** (1991): Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles* 10: 147-172.

**Delmas V., Strokes D. G., Perry R. P.** (1993): A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 2414-2418.

**Dubiec A., Zagalska-Neubauer M.** (2006): Molecular techniques for sex identification in birds. *Biology Letters* 43: 3-12.

**Dungel J., Hudec K.** (2011): *Atlas ptáků*. Academia Praha.

**Dvořák J., Harverson J. L., Gulick P., Rauen K. A., Abbott U. K., Kelly B. J., Shultz F. T.** (1992): cDNA cloning of a Z- and W-linked gene in gallinaceous birds. *Journal of Heredity* 83: 22-25.

**Ellegren H.** (1996): First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences* 263: 1635-1641.

**Ellegren H., Fridolfsson A.-K.** (1997): Male-driven evolution of DNA sequences in birds. *Nature Genetics* 17: 182-184.

**Ellegren H., Sheldon B. C.** (1997): New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. *Trends in Ecology & Evolution* 12: 255-259.

**Epplen J. T., Ammer H., Epplen C., Kammerbauer C., Mitreiter R., Roewer L., Schwaiger W., Steimle V., Zischler H., Albert E., G. Andreas, Beyermann B., Mayer W., Buitkamp J., Nanda I., Schmid M., Nurnberg P., Pena S. D. J., Poche H., Sprecher W., Scharl M., Weising K., Yassouridis A.** (1991): Oligonucleotide fingerprinting using simple repeat motifs: A convenient, ubiquitously applicable method to detect hypervariability for multiple purposes. *DNA fingerprinting: Approaches and applications*: 50-69.

**Fridolfsson A.-K., Ellegren H.** (1999): A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.

**Fridolfsson A.-K., Cheng H., Copeland N. G., Jenkins N. A., Liu H.-C., Raudsepp T., Woodage T., Chowdhary B., Halverson J., Ellegren H.** (1998): Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 8147-8152.

**Gasser R. B., Hu M., Chilton N. B., Campbell B. E., Jex A. J., Otrando D., Cafarchia C., Beveridge I., Zhu X.** (2006): Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols* 1: 3121-3128.

**Geyer C. J., Ryder O. A., Chennick L. G., Thompson E. A.** (1993): Analysis of relatedness in the California Condors, from DNA fingerprints. *Molecular Biology and Evolution* 10: 571-589.

**Graves J. A. M.** (1995): The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes - an evolving understanding. *BioEssays* 17: 311-321.

**Griffiths R.** (1992): Sex-biased mortality in the Lesser Black-backed Gull *Larus fuscus* during the nestling stage. *Ibis* 134: 237-244.



**Griffiths R., Daan S., Dijkstra C.** (1996): Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences* 263: 1251-1256.

**Griffiths R., Holland P. W. H.** (1990): A novel avian W chromosome DNA repeat sequence in the lesser black-backed gull (*Larus fuscus*). *Chromosoma* 99: 243-250.

**Griffiths R., Korn R. M.** (1997): A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene* 197: 225-229.

**Griffiths R., Tiwari B.** (1993): The isolation of the molecular genetic markers for the identification of sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8324-8326.

**Griffiths R., Tiwari B.** (1995): Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature* 375: 454.

**Griffiths R., Tiwari B.** (1996): Avian CHD genes and their use in methods for sex identification in birds. International Patent Publication no. WO/1996/039505, Isis Innovation, Oxford.

**Griffiths R., Tiwari B., Becher A.** (1992): The identification of sex in the starling *Sturnus vulgaris* using a molecular DNA technique. *Molecular Ecology* 1: 191-194.

**Griffiths R., Double, M. C., Orr K., Dawson R. J. G.** (1998): A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.

**Griffiths R., Phil D.** (2000): Sex identification in Birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 9: 14-26.

**Hackett S. J., Kimball R. T., Reddy S., Bowie R. C. K., Braun E. L., Braun M. J., Chojnovsky J. L., Cox A., Han K.-L., Harshman J., Huddleston C. J., Marks B. D., Miglia K. J., Moore W. S., Sheldon F. H., Steadman D. W., Witt C. C., Yuri T.** (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320: 1763-1767.

**Hadrys H., Balick M., Schierwater B.** (1992): Applications of random amplified polymorphic DNA (RADP) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1:55-63.

**Han J.-I., Jang H.-J., Cheong S., Kim S., Park S.-R., Na K.-J.** (2009): Sex determination by PCR-RFLP in the Oriental White Stork (*Ciconia boyciana*). *Zoological Studies* 48: 619-624.

**Huang M. C., Lin W. C., Horng Y. M., Rouvier R., Huang C. W.** (2003): Female-specific DNA sequences in Geese. *British Poultry Science* 44: 359-364.

**Chue J., Smith C. A.** (2011): Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *The FEBS Journal* 278: 1027-1034.

**Jeffreys A. J., Wilson V., Kelly R., Taylor B. A., Bulfield G.** (1987): Mouse DNA "fingerprints": analysis of chromosome localization and germ-line stability of hypervariable loci in recombinant strains. *Nucleic Acids Research* 15: 2823-2836.

**Kahn N. W., Judith S. J., Quinn T. W.** (1998): Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide a simple and efficient method for sex identification in birds. *The Auk* 115: 1074-1078.

**Kashi Y., Tikochinsky Y., Genislaw E., Iraqi F., Nave A., Backmann J. S., Gruenbaum Y., Soller M.** (1990): Large restriction fragments containing poly-TG are highly polymorphic in a variety of vertebrates. *Nucleic Acids Research* 18: 1129-1132.

**Kloskowski J., Grela P., Krogulec J., Gaška M., Tchórzewski M.** (2006): Sexing Red-necked Grebes *Podiceps grisegena* by molecular techniques and morphology. *Acta Ornithologica* 41: 176-180.

**Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R.** (1991): Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.

**Kvapilová M.** (2009): Molekulární determinace pohlaví u vybraných ptačích druhů. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL.

**Lessels C. M., Mateman A. C.** (1998): Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RADP) markers. *Molecular Ecology* 7: 187-195.

**Livezey B. C., Zusi R. L.** (2007): Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. *Zoological Journal of the Linnean Society* 149: 1–95.

**Longmire J. L., Ambrose R. E., Brown N. C., Cade T. J., Maechtle T. L., Seegar W. S., Ward F. P., White C. M.** (1991): Use of sex-linked minisatellite fragments to investigate genetic differentiation and migration of north American populations of the Peregrine Falcon (*Falco peregrines*). *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*: 217-229.

**Longmire J. L., Maltbie M., Pavelka R. W., Smith L. M., Witte S. M., Ryder O. A., Ellsworth D. L., Baker R. J.** (1993): Gender identification in birds using microsatellite DNA fingerprint analysis. *The Auk* 110: 378-381.

**Maniatis T., Tritsch E. E., Sambrook J.** (1982): *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

**McRae S. B., Kovacs K. M.** (1991): Male-specific markers in Hooded Seal DNA fingerprints. *Fingerprint News* 3: 10-11.

**Millar C. D., Lambert D. M., Bellamy A. R., Stapleton P. M., Young E. C.** (1992): Sex-specific restriction fragment and sex ratios revealed by DNA fingerprinting in the brown skua. *Journal of Heredity* 83: 350-355.

**Nesje M., Roed K. H.** (2000): Brief report. Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers. *Hereditas* 132: 261-263.

**Nicolai J., Singer D., Wothe K.** (2002): *Kapesní atlas: Ptáci*. Slovart Praha.

**Ohno S.** (1967): *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Springer-Verlag New York.

**Peters J. L., Traylor M. A., Mayr E., Greenway J. C., Paynter R. A., Cottrell G. W.** (1979): Check-list of birds of the World. Museum of Comparative Anatomy, Cambridge: 1931-1979.

**Rabenold R. R., Rabenold K. N., Piper W. H., Minchella D. J.** (1991): Density-dependent dispersal in social wrens: genetic analysis using novel matriline markers. *Animal Behaviour* 42: 144-146.

**Ramos P. S., Bastos E., Mannan R. W., Guedes-Pinto H.** (2009): Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism applied to sex identification of *Accipiter cooperii*. *Molecular and Cellular probes* 23: 115-118.

**Roldan E. R. S., Gomendio M.** (1999): The Y chromosome as a battle ground for sexual selection. *Tree* 14: 58-62.

**Seutin G., White B. N., Boag P. T.** (1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Canadian Journal of Zoology* 69: 82-90.

**Shetty S., Kirby P., Zarkower D., Graves J. A. M.** (2002): DMRT1 in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and discovery of putative regulatory element. *Cytogenetics and Genome Research* 99: 245-251.

**Sibley C. G., Monroe B. L.** (1990): Distribution and taxonomy of birds of the World. Yale University Press, New Haven.

**Sinclair A. H., Berta P., Palmer M. S., Hawkins J. R., Griffiths B. L., Smith M. J., Foster J. W., Frischauf A.-M., Lovell-Badge R., Goodfellow P. N.** (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 364: 240-244.

**Svensson L., Grant P. J.** (2004): Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého východu. Svojtka & Co. Praha.

**Takagi N., Itoh M., Sasaki M.** (1972): Chromosome studies in four species of Ratitae (Aves). *Chromosoma* 36: 281-291.

**Tone M., Nakano N., Takao E., Narisawa S., Mizuno S.** (1982): Demonstration of W chromosome-specific repetitive DNA sequences in the Domestic Fowl, *Gallus g. domesticus*. *Chromosoma* 86: 551-569.

**Valenzuela N.** (2004): Temperature-dependent sex determination. *Reptilian Incubation: Environment & Behaviour*. Nottingham University Press: 211-227.

**Wakisaka H., Nakagawa M., Wakisaka K., Itoh M.** (2006): Molecular sexing and sexual difference in carpal spur length of the Gray-headed Lapwing *Vanellus cinereus* (Charadriidae). *Ornithological Science* 5: 133-137.

**Wang L.-C., Chen C.-T., Lee H.-Y., Li S.-H., Lir T.-J., Chin S.-C., Pu C.-E., Wang C.-H.** (2007): Sexing a wider range of avian species based on two CHD1 introns with an unified reaction condition. *Zoo Biology* 26: 425-431.

**Wang N., Zhang Z.-W.** (2009): The novel primers for sex identification in the brown eared-pheasant and their application to other species. *Molecular Ecology Resources* 9: 186-188.

**Wang Z., Zhou X., Lin Q., Fang W., Chen X.** (2010): New primers for sex identification in the Chinese Egret and other ardeid species. *Molecular Ecology Resources* 11: 176-179.

**Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A., Tingey S. V.** (1993): Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218: 704-740.

**Yamauchi A., Telschow A., Kobayashi Y.** (2010): Evolution of cytoplasmic sex ratio distorters: Effect of paternal transmission. *Journal of Theoretical Biology* 266: 79-87.

Genomová databáze (*Gallus gallus*), navštívena dne 3. července 2012:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=9031&chr=W>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=9031&chr=Z>

Databáze proteinových rodin a domén (CHD1, *Gallus gallus*), navštíveny dne 5. července 2012:

<http://pfam.sanger.ac.uk/protein/B6ZLK2>

[http://smart.embl.de/smart/show\\_motifs.pl?ID=B6ZLK2](http://smart.embl.de/smart/show_motifs.pl?ID=B6ZLK2)

Databáze NCBI, Probe, navštívena dne 27. července:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	adenin (purinová báze)
aa	amino acid/acids = aminokyselina/aminokyseliny
bp	base pair/pairs = pár/páry nukleotidových bází
C	cytosin (pyrimidinová báze)
cDNA	komplementární DNA
F	forward primer
G	guanin (purinová báze)
CHD1	Chromomo-Helicase-DNA-binding protein 1
CHD1-A	gen kódující Chromomo-Helicase-DNA-binding protein 1 u ptáků (Avian)
CHD1W	gen kódující Chromomo-Helicase-DNA-binding protein 1na W chromozomu
CHD1Z	gen kódující Chromomo-Helicase-DNA-binding protein 1na Z chromozomu
PCR	polymerázová řetězová reakce
R	reverse primer; v sekvenci DNA představuje purinovou bázi: adenin/guanin (R=A/G)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSCP	Single Strang Conformation Polymorphism
T	tymin (pyrimidinová báze)
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
W	chromozom W
W <sub>1</sub>	alelová forma genu na W chromozomu
Z	chromozom Z
Z <sub>1</sub>	alelová forma genu na Z chromozomu
Z <sub>2</sub>	alelová forma genu na Z chromozomu
Y	pyrimidinová báze: cytozin/tymin (Y=C/T)
♂	samec
♀	samice