

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ**  
**AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**BRNO 2015**

**IVA RÁDSETOULALOVÁ**

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat**

---



**Určení pohlaví ptáků analýzou DNA**

Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*

doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

*Vypracovala:*

Iva Rádsetoulalová

Brno 2015

## **Zadání bakalářské práce**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem práci Určení pohlaví ptáků analýzou DNA vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne.....

Podpis.....

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky, vstřícnost při konzultacích a trpělivost při zpracování této bakalářské práce.

## **Abstrakt**

Ve své bakalářské práci – Určení pohlaví ptáků analýzou DNA, jsem se zabývala zpracováním informací o způsobech určování pohlaví u ptáků. Zaměřila jsem se na molekulární metody, zvláště na určování pohlaví analýzou DNA metodou PCR, která je založena na amplifikaci *CHD1* genu. *CHD1* gen se nachází na obou pohlavních chromozomech téměř u všech ptačích druhů. DNA se získává ze vzorků krve, pírů nebo podskořápečných membrán. Popsala jsem ptačí pohlavní soustavu, pohlavní chromozomy, nejčastější metody určování jejich pohlaví, metodu PCR a geny determinující pohlaví a geny využitelné pro určování pohlaví u ptáků.

**Klíčová slova:** *CHD1* gen, PCR, pohlavní chromozomy, molekulární metody

## **Abstract**

In my bachelor thesis – Determining the sex of birds by DNA analysis, I dealt with covering information about ways of determining sex of birds. I focused on molecular methods, especially sexing birds by analyzing DNA by PCR method, which is based on amplification of *CHD1* gen. *CHD1* gen is located on both sex chromosomes of almost all bird's species. DNA is getting out of blood samples, feathers or intact membranes. I described avian reproductive system, sex chromosomes, the most common methods of determining sex, PCR method and sex determining genes and genes usable for determining sex of birds.

**Keywords:** *CHD1* gen, PCR, sex chromosomes, molecular methods

## OBSAH

1	ÚVOD .....	9
2	CÍL PRÁCE .....	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	11
3.1	Zoologická charakteristika ptáků .....	11
3.2	Pohlavní soustava ptáků .....	12
3.2.1	Samčí pohlavní soustava .....	12
3.2.2	Samičí pohlavní soustava .....	14
3.3	Neurohumorální regulace u ptáků .....	15
3.4	Genom ptáků .....	17
3.5	Pohlavní chromozomy ptáků .....	17
3.5.1	Vývoj ptačích pohlavních chromozomů .....	19
3.6	Geny determinující pohlaví u ptáků .....	20
3.7	Gen <i>CHD1</i> .....	21
3.8	Určování pohlaví u ptáků .....	22
3.9	Tradiční metody určování pohlaví ptáků .....	23
3.9.1	Morfometrická analýza .....	23
3.9.2	Laparotomie a laparoskopie .....	23
3.9.3	Zavedení sexaskopu .....	24
3.9.4	Metody rozlišování pohlaví u jednodenní drůbeže .....	24
3.9.4.1	<i>Japonská kloakální metoda, Masuiho</i> .....	24
3.9.4.2	<i>Autosexing</i> .....	26
3.9.4.3	<i>Colorsexing</i> .....	26
3.9.4.4	<i>Peříčková metoda</i> .....	26
3.10	Genetické metody určování pohlaví ptáků .....	28
3.10.1	Chromozomální určování pohlaví u ptáků .....	28
3.10.2	Molekulárně biologické metody určování pohlaví u ptáků .....	29
3.10.2.1	<i>Izolace DNA</i> .....	30
3.10.2.2	<i>Určování pohlaví založené na amplifikaci CHD1 genu pomocí polymerázové řetězové reakce</i> .....	32
3.10.2.3	<i>Gelová elektroforéza</i> .....	35
3.10.3	Další metody určující pohlaví založené na polymerázové řetězové reakci .....	37
3.10.3.1	<i>Polymorfismus délky restričních fragmentů</i> .....	37

3.10.3.2	<i>Polymorfismus délky restričních fragmentů u produktů polymerázové reakce</i>	38
3.10.3.3	<i>Náhodná amplifikace polymorfní DNA</i>	39
3.10.3.4	<i>Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů</i>	40
3.10.3.5	<i>Polymorfismus konformace jednořetězců</i>	41
3.10.4	Stanovení pohlaví ptáků nadřádu běžci	42
3.10.4.1	<i>Fluorescenční hybridizace in situ</i>	42
4	ZÁVĚR	44
5	LITERATURA	46
6	SEZNAM OBRÁZKŮ	50

Přílohy



# 1 ÚVOD

Většina mnohobuněčných organismů je odděleného pohlaví. Jejich samčí a samičí pohlavní buňky se liší ve velikosti a organismy se rozmnožují pohlavně (anizogamie). Rozmnožovací soustava vzniká v embryonálním vývoji u obou pohlaví ze stejného základu – pohlavních lišt. Výsledek pohlavní determinace – zda jedinec bude produkovat relativně málo velkých samičích pohlavních buněk vajíček nebo mnoho malých samčích pohlavních buněk spermií, je ovlivněn různými mechanismy. Pohlaví může být určeno environmentálně (teplota, potrava, sociální postavení) nebo geneticky (genotyp, pohlavní chromozomy) a hormonálně (Bachtrog *et al.*, 2014; Chue & Smith, 2011).

Ptáci jsou gonochoristé, živočichové s odděleným pohlavím. Více než u poloviny ptačích druhů není výrazný pohlavní dimorfismus, čímž by se rozlišilo na základě exteriérových znaků samičí pohlaví od samčího. Mláďata ptáků jsou monomorfní, nelze u nich dle fenotypu spolehlivě rozlišit pohlaví. Informace o pohlaví jedince je důležitá v mnoha studiích ptačí ekologie, evoluční biologie a ochraně ohrožených druhů, ale také v chovu drůbeže, pro sestavení chovných párů a znovu navrácení populací do volné přírody i při snížení rizika přenosu nemocí (Thanou *et al.*, 2013).

Ne vždy lze pohlaví ptáků určit běžnými metodami, jako je např. morfometrická analýza, japonská kloakální metoda, autosexing apod. Z tohoto důvodu se v dnešní době pohlaví ptáků nejčastěji určuje analýzou DNA, pomocí metody PCR. Touto metodou lze vyšetřit mláďata hned po vylíhnutí i dospělé jedince. Popis těchto metod na určení pohlaví ptáků je předmětem méj bakalářské práce.

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo prostudovat recentní tuzemskou a zahraniční literaturu a popsat metody určení pohlaví u ptáků, zejména pomocí molekulárně biologických metod analýz DNA.

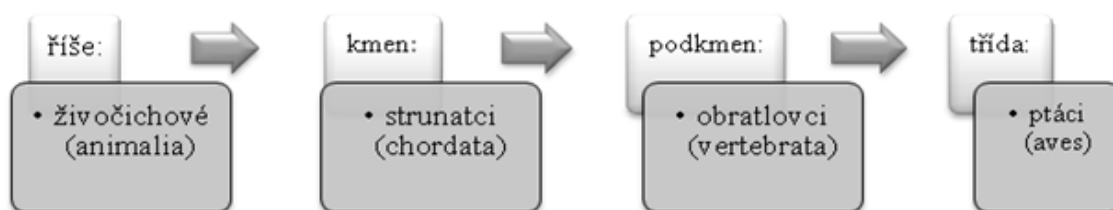
Dílčí cíle:

- Popis problematiky determinace pohlaví u ptáků.
- Charakterizace podstat tradičních i molekulárně biologických metod detekce pohlaví, uvedení příkladů a metodik určení pohlaví.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Zoologická charakteristika ptáků

Odborníci se domnívají, že v současnosti může žít na Zemi více než deset milionů živočišných druhů. Vědci zatím identifikovali více než jeden milion druhů. Živé organismy se rozdělují do pěti říší: bakterie, protista, rostliny, houby, živočichové. Obratlovci tvoří pouze 2,6 %, z toho ptáci 19 %. (Uhlenbroeková, 2009)



Obr 1: Zoologické zařazení ptáků; Zpracováno dle Uhlenbroeková (2009)

Ptáci tvoří taxonomicky samostatnou třídu – *Aves*. Nynější klasifikace rozlišuje 27 ptačích řádů, do nichž je zařazeno 8948 druhů (Černý, 2005), podle různých morfologických, genetických a behaviorálních znaků. Mezi anatomické znaky patří stavba pánevních končetin, většina ptáků má čtyři prsty, z nichž tři směřují kupředu a jeden dozadu (anizodaktylní noha). U některých je směřování prstů jiné (všechny dopředu, vratiprst) nebo je prstů méně (dva u pštrosa dvouprstého). Nynější metody studia DNA pomohly objasnit některé příbuzenské vztahy, občas dokonce vedly ke změnám dosavadního systému (objev příbuznosti kondorů s čápy) (Uhlenbroeková, 2009).

Ptáci vznikli asi před 150 miliony lety (pozdní období jury). Za jejich předchůdce je považován pták *Archeopteryx lithographica*, který měl *pleziomorfní* (plazí) i *apomorfní* (ptačí) znaky. Mezi plazí znaky patří mimo jiné dlouhý ocas, přítomnost zubů, tři prsty s drápy na koncích křídel. Mezi ptačí znaky se řadí opeřené tělo, klíční kosti spojené v pevnou vidlici (*furcula*) apod. (Černý, 2005; Veselovský, 2001).

Ptáci jako jediní mají peří a většina druhů létá. Jsou to teplokrevní živočichové, jejich srdce je rozděleno na čtyři části, mají vysokou úroveň metabolismu, jsou dvounozí (bipední), hrudní končetiny jsou přeměněny v křídla. Všichni mají zobáky, jsou vejcorodí, výrazně je rozvinuta péče o potomstvo. Ptáci jsou zřejmě nejrozšířenější skupinou obratlovců (Smrž, Horáček & Švátora 2004). Najdeme je na celém světě

kromě extrémně chladných oblastí, ty však mohou přeletovat (Uhlenbroeková, 2009). Porovnání morfologie a fyziologie ptáků a savců je uvedeno v tabulce přílohy 1.

### **3.2 Pohlavní soustava ptáků**

Pohlavní soustava ptáků je od té savčí odlišná. Slouží k rozmnožování a dělí se na samčí a samičí. K oplození dochází uvnitř těla samice, ale embryonální vývoj probíhá mimo tělo samice. Vzhledem k anatomii a fyziologii ptačího těla je potřeba, aby jejich pohlavní orgány byly co nejmenší a nejlehčí. Plně rozvinuty jsou vždy v období rozmnožování, kdy je jejich činnost zapotřebí – podléhají sezónním změnám (Veselovský, 2001). Ptáci nemají vyvinuté zevní pohlavní orgány ani přídatné pohlavní žlázy (Černý, 2005).

#### **3.2.1 Samčí pohlavní soustava**

Pohlavní soustavu samců tvoří pohlavní žlázy a vývodné cesty. Samčí pohlavní žlázy (*gonády*) představují varlata, vývodné cesty tvoří nadvarlata a chámovody. Párová varlata jsou na rozdíl od savců uvnitř tělní dutiny, zavěšena pod páteří v místě jejich embryonálního základu, kaudálním koncem se dotýkají předního oddílu ledvin. Ke stěnám tělní dutiny jsou upevněna pomocí vaziva (*mesorchium*), kterým vedou nervy a cévy. Levé varle bývá zpravidla větší než pravé. Díky cirkulaci vzduchu ve vzdušných vacích a poklesu tělesné teploty v noci jsou varlata ochlazována, jejich vnitřní teplota se sníží o 3–4 °C oproti tělesné, čímž jsou zajištěny optimální podmínky pro spermiogenezi. Varlata mají fazolovitý, vejčitý nebo oválný tvar. U mladých kohoutů a krocanů bývá na jejich povrchu pigmentace. V období rozmnožování se zvětšují, mění se i jejich barva ze žluté až černé na bílou. Například u kohouta měří varle v období klidu 3×1,5 cm a v období pohlavní aktivity 4–6×3 cm. Varlata jsou kryta pobřišnicí (*seróza*) a *tunicou albugineou*, která na rozdíl od savců nerozděluje parenchym varlete. Ten je u ptáků celistvý a je tvořen semenotvornými kanálky, které se při nadvarletním okraji narovnávají v přímé kanálky. Kanálky jsou vystlány zárodečným epitelem tvořeným zárodečnými a podpůrnými buňkami. V Sertoliho buňkách varlete se tvoří samčí pohlavní buňky (*gamety*) – spermie s haploidním počtem chromozomů. V Leydigových buňkách (intersticiální endokrinní, vmezeřené), které se nacházejí v intersticiálním vazivu spojujícím kanálky, je produkován samčí pohlavní hormon – testosteron (Černý, 2005; Veselovský, 2001).

Nadvarlata jsou u ptáků slabě vyvinuta, přikládají se k povrchu varlat na *dorzomediálním* (nadvarletním) okraji. U dospělého kohouta jsou jen 3 mm silná. Nerozlišuje se na nich hlava, tělo a ocas jako u savců, ale jen kraniální a kaudální pól. Z nadvarlat vedou souběžně s močovody tenké párové chámovody, které ústí do *urodea* kloaky a slouží částečně jako rezervoár spermií. Před vstupem do kloaky je v kličkách chámovodů až o 4 °C nižší teplota než v kloace. Nízká teplota zvyšuje odolnost a pohyblivost spermií, proto se zde shromažďují spermie před kopulací.

Kopulační orgán ptáků se označuje jako *phallus*, je uložený v kloace na spodině *proktodea*. Může být nevysunutelný (*phallus* u kohouta, krocana) nebo vysunutelný (u kačera a housera). Na rozdíl od savců je jeho funkce pouze reprodukční. Nevysunutelný *phallus* tvoří nízký laterální a mediální falický hrbolk. Tyto hrbolky jsou schopné určitého stupně erekce, po jejich stranách vedou lymfatické řasy, kudy pasivně protéká sperma. Při kopulaci dochází k přiblížení kloak a vychlípění proktodea. Na rozdíl od savců je u ptáků počet ejakulací mimořádně vysoký. Pro oplození celé snůšky vajec je zapotřebí kolem dvanácti kopulací, například kohout se pojímá 50–60× za den. Vyvinutý kopulační orgán šedožluté barvy mají pouze vrubozobí (kačer 8 cm při erekci), pštrosi (40 cm), emuové, nanduové, kasuáři, kiviové, tinamy, hokovití, snovači rodu *Bubalornis* (15 mm). Na tomto typu *phallu* se rozlišuje jeho baze a vysunovatelná část. Erektce je umožněna naplněním topořivého tělesa lymfou. Na povrchu *phallu* se nacházejí řasy, které se po jeho vysunutí před kopulací formují ve spirálovitě stočenou semennou brázdu. Ta se při erekci uzavře a vytvoří kanálek, kudy při ejakulaci pasivně protéká sperma. Samice mají nepatrný náznak *phallu*, jeho velikostní a tvarové odlišnosti se využívají k rozlišení pohlaví u jednodenních kuřat (japonská kloakální metoda) (Černý, 2005; Marvan *et al.*, 2003; Veselovský, 2001).

Ptačí spermie jsou dvakrát delší než u savců, v průměru měří 50–120 μm (u kohouta v průměru 90 μm, krocana 85 μm, housera 67 μm). Jejich bičík je delší než savčích spermií (80–90 μm). Hlavička spermie kryta akrozomem má u většiny druhů člunkovitý tvar, u pěvců spirálovitý. U ptáků chybí přídatné pohlavní žlázy, proto je jejich ejakulát tvořen převážně spermiemi. Jeden ejakulát obsahuje 1–3,5 miliardy spermií. Ptačí spermie mají vysokou životaschopnost. Ve vejcovodu samic leží mezi dělohou a vaginou uterovaginální svěrač, kde se nachází speciální hluboké tubuly tzv. depo spermií, místo, ve kterém se zadržují spermie. Díky tomu může samice izolovaná od samce určitou dobu snášet oplozená vejce (kur 7–14 dní, krůta 30–73 dní po kopulaci). (Černý, 2005; Veselovský, 2001)

### 3.2.2 Samičí pohlavní soustava

U samic ptáků je vyvinut pouze levostranný vaječník a vejcovod. Embryonálně se zakládají na obou stranách, ale už od čtvrtého dne dochází k asymetrické distribuci primordiálních zárodečných buněk. U kura se vývoj pravostranných orgánů ukončuje sedmý den inkubace. Někdy, zejména u dravců a kiviů, se objevují pravostranné orgány buď jako rudimenty nebo normálně vyvinuté, ale vždy bez funkce (Černý, 2005; Marvan *et al.*, 2003).

Samičí pohlavní žláza (*gonáda*) – vaječník, má hroznovitý tvar, je zavěšen u stropu tělní dutiny na krátkém *mesovariu* u předního oddílu levé ledviny. Tvoří se v něm samičí pohlavní buňky (*gamety*) – vajíčka a pohlavní hormony estrogeny. U křepelky váží vaječník v době mimo snášku v průměru 15 mg, v období pohlavní aktivity dochází k jeho zvětšení, kdy jeho hmotnost vzroste až na 6500 mg. Povrch pokrývá epitel, pod ním se nachází vazivová vrstva *tunica albuginea*. Na kůře vaječníku visí desítky folikulů s oocyty. Dřeňovou vrstvu tvoří hladkosvalové buňky, vazivo s cévami, nervy. Počet oogonií je u devíti denního kuřete 28 000, u sedmnácti denního kuřete 680 000 a při vylíhnutí 480 000 – oogeneze je již ukončena. V dospělosti je cca 2000 viditelných oocytů, z nichž dozraje a ovuluje 250–500 oocytů. Folikuly vaječníku postupně dozrávají a jsou proto různé velikosti. U kura se zde nachází čtyři až šest velkých F folikulů o průměru 20–40 mm, naplněných žlutkem, dále větší počet malých žlutých folikulů o průměru 6–12 mm a řada malých bílých folikulů o velikosti méně než 6 mm. Při ovulaci dochází k prasknutí folikulu v místě zvaném *stigma* – úzký pruh uprostřed folikulu s tenčí stěnou, bez cév. Oocyt je zachycen nálevkou vejcovodu, kde dochází ke druhému zracímu dělení a tím k redukci chromozomů na haploidní počet. Po ovulaci zůstává na vaječníku poovulační folikul. U kura dochází během šesti až deseti dní k apoptóze poovulačního folikulu (Černý, 2005; Veselovský, 2001).

U samičí pohlavní soustavy tvoří vývodnou cestu vejcovod, který je zavěšen na dvojitém serózním vazuu. Funkční je pouze levý vejcovod, u něhož probíhá rychlý rozvoj od šestnáctého týdne, tj. jeden až dva týdny před pohlavní dospělostí samice. V době snášky je již plně funkční – dlouhá, tlustostěnná trubice, složená v četné kličky, ústící do *urodea* kloaky, u kura je dlouhý 60–80 cm, u husy 1 m, jeho stěna je asi 0,5 cm tlustá a vyplňuje podstatnou část levé poloviny tělní dutiny. V období klidu je u slepice 15 cm dlouhý a váží 5 g (v období snášky 75 g). Stěny vejcovodu tvoří sliznice, hladká kruhovitě uspořádaná svalová vrstva zajišťující posun vejce i transport spermií a seróza. Vejcovod se skládá z pěti částí: nálevka (*infundibulum*), bílkotvorná

část (*magnum*), krček (*isthmus*), děloha (*uterus*), pochva (*vagina*). Kraniální část vejcovodu se rozšiřuje v nálevku, její třásně se z ventrální strany přikládají k vaječníku, se kterým není pevně spojena. Po ovulaci zachycuje vajíčko a může zde dojít k oplození. Oplozené vajíčko prochází částmi pohlavního ústrojí samice a postupně se z něj stává vejce. Zároveň vznikají první stadia vývoje zárodku. Po snesení vejce je další vývoj zárodku zastaven, dokud nenastanou vhodné teplotní podmínky (Černý, 2005; Marvan *et al.*, 2003; Veselovský, 2001).

Kloaka je konečný vývod soustavy trávicí, močové, pohlavní. Je to nálevkovitá dutina končící zevním otvorem. U kura je 2,5 cm dlouhá a 2–2,5 cm široká. Lze ji rozdělit na tři ne příliš zřetelné části, od sebe oddělené slizničními řasami, *koprodeum*, *urodeum* a *proktodeum*. *Koprodeum* je rozšířená část konečníku, kde se shromažďuje trus, kaudálně od něj, za slizniční řasou, se nachází *urodeum*, na jehož stropě ústí párové močovody, ventrálně pak vejcovod (u samců chámovody). Konecová část kloaky se nazývá *proktodeum* – navenek se otevírá kloakálním otvorem se svěračem, (je zde uložen samčí kopulační orgán), u mladých ptáků ústí na stropě proktodea kloakální burza, u dospělých po ní zůstává pouze vazivový pruh. (Černý, 2005; Marvan *et al.*, 2003)

### 3.3 Neurohumorální regulace u ptáků

Pohlavní ústrojí vzniká u obou pohlaví ze stejného základu – pohlavních lišt. Při nepřítomnosti specifických pohlavních hormonů nebo signálů (estrogen u ptáků) se u jedince vyvíjí homogametní pohlaví – u ptáků ZZ (samec) (Giesy *et al.*, 2003).

Období vhodné k rozmnožování a následné péči o potomstvo určují faktory vnějšího prostředí, které ovlivňují hladiny hormonů v těle. Podněty z vnějšího prostředí jsou přijímány smyslovými orgány, zpracovány v mozkové kůře, která je dále předává do hypotalamu. Hypotalamus vytváří specifické uvolňovací hormony (RF – releasing factors), které řídí celý systém hormonální regulace. Pohlavní funkce je tedy řízena neurohumorálně. Jednotlivé nervové a humorální složky na sebe navazují a vzájemně se ovlivňují (Černý, 2005; Šípek, 2014; Veselovský, 2001).

Hypotalamus ovlivňuje produkci hormonů, je spojen se žlázou s vnitřní sekrecí – hypofýzou a řídí tak její sekretorickou činnost. Adenohypofýza produkuje pod kontrolou hypotalamických hormonů – statinů a liberinů, hormony, které působí na cílové buňky a ovlivňují tím sekreci hormonů v jiných orgánech. Mezi hormony

adenohypofýzy podílející se přímým i nepřímým způsobem na funkci pohlavní soustavy patří:

- adrenokortikotropní hormon (ACTH) – ovlivňuje činnost kůry nadledvin
- tyreotropní hormon (TSH) – řídí činnost štítné žlázy
- folikuly stimulující hormon (FSH) – podporuje tvorbu samčích pohlavních buněk, spermatogenezi, u samic růst a vývoj folikulů, produkci estrogenů ve vaječniku
- luteinizační hormon (LH) – působí na Leydigovy buňky varlete a tím stimuluje tvorbu testosteronu, s FSH přeměňuje ve stěně vaječniku testosteron na estrogen, dává podnět k tvorbě progesteronu, podmiňuje ovulaci
- somatotropin (GH, STH) – růstový hormon, ovlivňuje růst organismu a odbourávání tuku
- prolaktin (PRL) – vliv na produkci sýrovité hmoty ve voleti holubů, tekutin u plameňáků, tučňáků, kterou krmí svá mláďata, tlumí činnost pohlavních žláz a tím i tvorbu pohlavních hormonů, vyvolává rodičovské chování.

V neurohypofýze se vytváří vazotocin (ADH) a mezotocin (MS). Tyto dva hormony způsobují při snášení vajec stahy svaloviny vejcovodu (Černý, 2005; Šípek, 2014; Veselovský, 2001).

Pohlavní hormony se tvoří přímo v pohlavních žlázách – u samců ve varlatech, u samic ve vaječnících; částečně také v kůře nadledvin. Jedná se o steroidní hormony. Jejich produkce je ovlivňována sezónností. Řídí vývoj a funkci pohlavních orgánů, vznik sekundárních pohlavních znaků, formování pohlavního pudu a tím i pohlavní chování, ovlivňují stavbu ptačích hnízd. Ze samčích pohlavních hormonů – androgenů, je nejdůležitějším testosteron. Ptáci bez něj nezpívají. Zvýšená hladina testosteronu způsobuje změnu barvy zobáku, nažin na hlavě a krku, u samců i agresivní chování spojené s obranou teritoria a mláďat. Také výrazně zlepšuje schopnost učit se. Mezi samičí pohlavní hormony patří estrogény (estradiol, estron, estriol) a gestagény (progesteron). Na samičí pohlavní chování mají vliv estrogény, ale plně se projeví až vlivem progesteronu (Šípek, 2014; Veselovský, 2001).

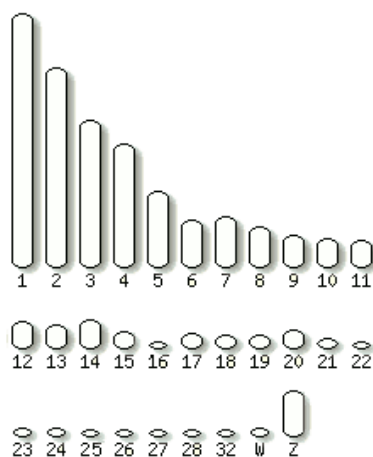
Hormon prostaglandin vzniká z mastných kyselin, ovládá hladkou svalovinu vejcovodu, usnadňuje transport vajec pohlavním aparátem samice a snášení vajec (Veselovský, 2001).



### 3.4 Genom ptáků

Genom je úplný soubor genetické informace, jedná se o celkovou sekvenci nukleových kyselin (DNA, případně RNA) v tělních buňkách organismu. U eukaryotické buňky je největší část genomu uložena v jejím jádře – soubor genů v chromozomech, tzv. jaderný genom. Mitochondriální (v mitochondriích) případně plastidový (v plastidech) genom je označován jako mimojaderný. Molekula DNA může být kružnicová (prokaryota, DNA-viry, extrachromozomální – plazmidová, chloroplastová, mitochondriální) nebo lineární (eukaryota, DNA-viry) (Flegr, 2009; Šmarda, 2003; Šmarda *et al.*, 2005).

Ptáci jsou hojně využíváni jako model pro zkoumání vývojových a ekologických otázek. Do roku 2010 byly přečteny celé genomy pouze tří ptačích druhů: kura bankivského, zebřičky pestré a krocana. V prosinci roku 2014 byly publikovány závěry čtyři roky trvajícího mnohamilionového výzkumného programu *Avian Phylogenomics Project*, jehož výsledkem je čtyřicet pět nově osekvenovaných kompletních ptačích genomů (Radevic, 2014). Ve velkém měřítku byly provedeny fylogenetické analýzy, byly prošetřeny ptačí rodokmeny, evoluce jejich genomu a pohlavních chromozomů, molekulární základ letu, ztráta zubů, hlasové učení a ohrožení ptáci. *Avian Phylogenomics Project* si klade za cíl osekvenovat 10 000 ptačích genomů, čehož by se mělo dosáhnout někdy po roce 2020 (Radevic, 2014).



Obr 2: Karyotyp kura bankivského (*Gallus gallus*); Převzato z *Germonline.org* (2015)

### 3.5 Pohlavní chromozomy ptáků

Chromozomy jsou komplexní strukturou v jádře buňky. Skládají se z DNA (s jejími geny) a z proteinů (převážně histonů), RNA, polysacharidů. Molekula DNA obtáčí shluk histonových jader. Každé jádro se skládá z osmi molekul zásaditého proteinu

histonu, tento komplex se nazývá nukleozom a je základní jednotkou chromatinového vlákna neboli nukleohistonu, který vyplňuje chromatidu. Chromatida je složena z ramene p a q, která jsou od sebe oddělena centromerou (zaškrčení), ta se nachází v místě primárního zúžení. Na komponenty centromery (kinetochora) se upínají mikrotubuly dělicího vřeténka. V metafázi mitotického buněčného dělení se chromatinové vlákno spiralizuje, současně se transkribuje a tím se chromozomy stávají pozorovatelnými optickým mikroskopem, metafázní chromozom má dvě viditelné chromatidy s centromerou. V interfázi jsou chromozomy rozvinuty a jejich viditelnost se ztrácí. Nukleozomy navazují na sebe a tvoří heterochromatin. V ostatních částech se střídají nukleozomy s rozvinutými vlákny, tyto části jsou tvořeny euchromatinem (Marvan *et al.*, 2003, Šmarda, 2003).

Chromozomy lze rozdělit na somatické (autozomy, tělní) a pohlavní chromozomy (gonozomy, heterochromozomy). Pohlavní chromozomy určují pohlaví jedince, jsou dva, u ptáků označované jako chromozom Z a chromozom W (Marvan *et al.*, 2003, Šmarda, 2003). Pohlavní buňky jsou haploidní, při meióze (redukčním dělení) dochází k redukci počtu chromozomů ze dvou na jeden. K diploidizaci dojde splynutím dvou pohlavních buněk (amfimixie), většinou od dvou různých jedinců v populaci (Flegr, 2009).

Ptáci zařazovaní do nadřádu letci (*Neognathae*) mají odlišné pohlavní chromozomy. Samičí W chromozomy jsou menší než samčí Z chromozomy, jsou vysoce heterochromatizované a replikující se později (Genomia, 2015). Chromozomy Z mají podobnou velikost a jsou na rozdíl od chromozomů W geneticky bohatší i větší. Chromozom Z představuje 7–10 % haploidního genomu (chromozom W jen něco kolem 1,5 %). Je do značné míry heterochromatický, pozdě replikován a má několik opravdových genů (Smith & Sinclair, 2004). W chromozom se liší svojí velikostí u různých ptačích druhů. Ptáci nadřádu běžci (*Paleognathae*, *Ratitae*) mají zachované nejprimitivnější formy ptačích pohlavních chromozomů Z a W, které jsou homomorfní (morfologicky nerozlišené), euchromatické a cytologicky nerozeznatelné. Tyto dva nadřády – letci a běžci, se evolučně oddělily před 120 milióny lety. U tinam (*Tinamiformes*), které jsou fylogeneticky řazeny k běžcům, se polovina až dvě třetiny chromozomu W skládá z heterochromatinu. Z tohoto důvodu jsou jejich pohlavní chromozomy W považovány za mezistupeň mezi heterochromatizovanými W chromozomy běžců a chromatinizovanými W chromozomy letců. Což dokládají i cytogenetické studie na úrovni meiotického párování chromozomů (Genomia, 2015).

Nicméně, u většiny ptačích druhů je chromozom W menší než Z chromozom a nese jen několik genů (u kuřete čtyři). Geny jsou umístěny lineárně za sebou v určitém pořadí a tím vytvářejí tzv. chromozomovou mapu. Chromozomová mapa zařazuje geny do konkrétních proužků na ramenech chromozomů (Marvan *et al.*, 2003, Šmarda, 2003). Několik genů bylo zjištěno na chromozomu W na malé euchromatické oblasti v blízkosti špičky krátkého ramene. Nejméně tři z nich (*ATP5A*, *ICHS* a *ASW*) mají homologii na Z chromozomu. Většina genů na kuřecím Z chromozomu má své homology na lidských chromozomech 5, 8, 9, 18. Např. gen *DMRT1* je přítomen na kuřecím Z a také na lidském 9. chromozomu. (Smith & Sinclair, 2004)

### 3.5.1 Vývoj ptačích pohlavních chromozomů

U ptáků se uplatňuje mechanismus chromozomálního určování pohlaví (CSD) se samčími nebo samičími heterogametami. CSD (Chromosomal Sex Determination) lze nalézt mezi fylogeneticky rozdílnými taxony, jako jsou ploštenci, hlístice, hmyz, koryšci, obojživelníci, plazi, ptáci a savci, ale nemusí být nutně jediným mechanismem k dispozici v příslušném taxonu (Fridolfsson *et al.*, 1998). Přes rozdíly ve velikosti a v genovém obsahu mezi heteromorfními pohlavními chromozomy, existuje důkaz o tom, že se vyvinuly z autozomálního páru. Ohnova hypotéza předpovídá, že W chromozom a všechny geny na něm, se vyvinul z chromozomu Z postupnou degradací nerekombinovatelné pohlavně specifické oblasti během posledních 200–300 milionů let. Tato hypotéza také bere v úvahu různé stupně ZW homologie u různých ptačích skupin. To naznačuje, že geny podílející se na určení pohlaví získaly jejich pohlavně specifické role docela nedávno v evoluci. Z chromozom si udržel původní velikost a genový obsah, ale W chromozom měl postupně degenerovat (Graves & Shetty, 2001). W chromozom je mnohem menší než chromozom Z a ukazuje další typické příznaky degenerovaného pohlavního chromozomu, tj. s nízkým obsahem genu, který je bohatý na heterochromatickou, repetitivní DNA satelitního typu (Fridolfsson *et al.*, 1998). Srovnávací mapování podporuje tuto hypotézu a ukazuje, že k diferenciaci pohlavních chromozomů došlo nezávisle, alespoň u savců a ptáků.

Nezávislý vývoj XY a ZW pohlavních chromozomů z různých autozomálních párů musí být zahájen také rozdílnými geny stanovujícími pohlaví. Přestože výchozí autozomální pár byl jiný, stejně tak alela určující pohlaví, proces evoluce pohlavních chromozomů u savců a ptáků byl zcela rovnoběžný. Chromozomální evoluční teorie předpokládá, že pohlavní chromozomy vznikly následujícím způsobem: vznik genu

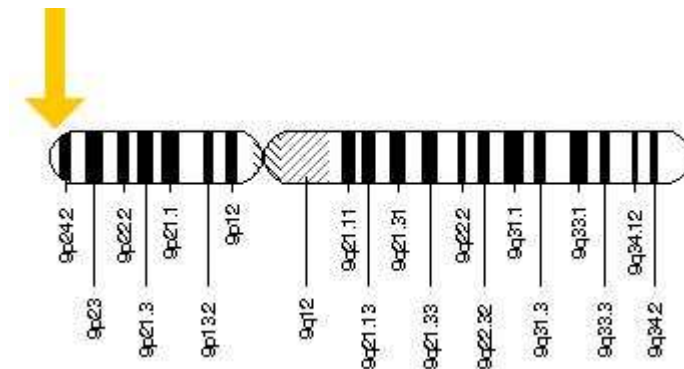
určujícího pohlaví na autozomálním páru (získání alely, která řídí krok v diferenciaci *gonád*), nahromadění sexuálně antagonistických genů kolem genu určujícího pohlaví, potlačení rekombinace v okolí genu určujícího pohlaví, postupná divergence a degenerace nerekombinovatelné části nepárového pohlavního chromozomu (Reifová, 2013).

Ptačí chromozom Z a savčí X nesdílejí žádné geny. Ptačí W chromozom je pozůstatek chromozomu Z a savčí chromozom Y pozůstatek X chromozomu. Malé heterochromatické chromozomy W a Y nemají k sobě navzájem žádný vztah. Nepřítomnost homologie mezi savčím chromozomem X a ptačím chromozomem Z tedy znamená, že XX:XY a ZW:ZZ systémy se vyvinuly nezávisle na sobě z různých autozomálních párů již u primitivních plazů (Graves & Shetty, 2001).

### 3.6 Geny determinující pohlaví u ptáků

V průběhu embryonálního vývoje je rozhodnuto o pohlavním fenotypu daného jedince. Pohlavní diferenciaci *gonád* regulují genetické a hormonální cesty (Chue & Smith, 2011). Hlavním genem určující pohlaví ptáků je gen *DMRT1* (*Doublesex and Mab3-related transcription factor 1*). Název tohoto genu je odvozen od jeho příbuznosti se dvěma pohlaví určujícími geny bezobratlých – *Drosophila doublesex* a hádátka *Gen Mab* gen. *DMRT1* se nachází na chromozomu Z, nemá žádný homolog na chromozomu W. Tento gen je důležitý při vývoji varlat. U samců (ZZ) je exprese *DMRT1* vyšší než u samic (ZW). Snížení exprese genu *DMRT1* u samců způsobí částečné převrácení pohlaví a vývoj samičího fenotypu. Tento gen je vyjádřen zejména u *gonád* kuřecích embryí (Reifová, 2013; Graves & Shetty, 2001).

Dalšími geny podílejícími se na determinaci pohlaví u ptáků jsou *FOXL2* (Forkhead box gen L2) a *RSPO1/WNT4* (R-spondin 1/Wingless-type MMTV integration site family, member 4). Tyto geny se podílejí na diferenciaci samičích pohlavních žláz – vaječnicích (Chue & Smith, 2011). Gen *FOXL2* je také vyjádřen u *gonád* kuřecích embryí, později jen u samičích (Smith & Sinclair, 2004). Gen *SOX* (*SOX9*) je rozhodující v určení pohlaví u všech obratlovců (Graves & Shetty, 2001). Genová exprese při gonadální diferenciaci pohlaví u kuřecího embrya je znázorněna v příloze 2.



Obr 3: Gen *DMRT1* je lokalizován na krátkém (p) rameni 9. chromozomu na pozici 24.3; Převzato z *Ghr.nlm.nih.gov* (2015)

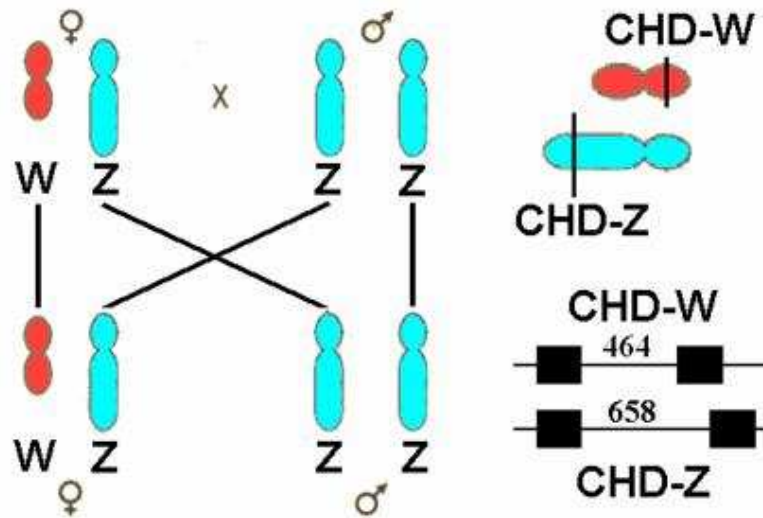
### 3.7 Gen *CHD1*

Gen *CHD1* (*chromodomain helicase DNA binding protein 1*) (Birdgenenames.org, 2012) kóduje protein, který reguluje aktivaci transkripce na úrovni chromatinu. Nachází se u obou pohlavních chromozomů u téměř všech ptačích druhů. Výjimku tvoří nadřád běžci, kteří mají nerozlišitelné pohlavní chromozomy. Ptačí *CHD1* geny patří do rodiny genů složených ze sekvencí pro chromatinové uspořádání (chromo doména – C), helikázovou doménu (H), souvisí s rodinou proteinů SNF2, a DNA vazebnou doménu (D), proto zkratka *CHD* (Fridolfsson & Ellegren, 2000; Vucicevic *et al*, 2012).

V roce 1995 molekulární metody pro identifikaci pohlaví u ptáků zásadně ovlivnilo objevení prvního genu umístěného na chromozomu W. Tento objev učinili Griffiths a Tiwari, když se pokoušeli určit pohlaví u posledního volně žijícího jedince druhu ara Spixův (*Cyanopsitta spixii*) (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). V roce 1996 týmy Ellegrena a Griffithse nezávisle na sobě zjistili, že se jedná o *CHD1* gen. Podle umístění se označuje jako *CHD1-W* gen. Brzy objevili kopii tohoto genu také na Z chromozomu, označovanou jako *CHD1-Z* gen. Dosud není známo, zda ptačí *CHD1-Z* a *CHD1-W* jsou funkčně diferencované (Fridolfsson & Ellegren, 2000). Oba geny jsou vysoce konzervativní a to jak s ohledem na *CHD1* geny u jiných organismů, tak k sobě navzájem. Nedostatek rekombinace mezi Z a W kopiemi tohoto genu naznačuje, že se nachází mimo pseudoautozomální oblast (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). *CHD1-Z* a *CHD1-W* geny se vyvinuly nezávisle na sobě, bez známek výměny genetické informace (např. prostřednictvím rekombinace) mezi Z a W chromozomy (Fridolfsson & Ellegren, 2000).

*CHD* geny se přímo nepodílí na vývoji a diferenciaci pohlaví u ptáků. Obsahují nejméně dva introny, které se nacházejí mezi pomalu vyvíjejícími se kódujícími

fragmenty, které se liší v délce u Z a W chromozomů, proto je lze využít k identifikaci pohlaví. (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006)



Obr 4: CHD-Z a CHD-W geny, délky PCR produktů u kolpíka malého (*Platalea minor*); Převzato z Cheng et al. (2005)

### 3.8 Určování pohlaví u ptáků

U ptáků je pohlaví určeno geneticky, podle pohlavních chromozomů. Pohlavní žlázy se v embryonálním stádiu zakládají ze stejného základu – pohlavních lišt, poté nastane jejich diferenciaci a vyvinou se z nich u samců varlata nebo vaječníky u samic. Vývoj sexuálního fenotypu je regulován genetickými a hormonálními cestami (Chue & Smith, 2011).

Ptáci jsou gonochoristé, živočichové s odděleným pohlavím. Přesto je problematické u více než poloviny ptačích druhů rozlišit jedince samčího pohlaví od samičího. Ne u všech je výrazný pohlavní dimorfismus, kterým by se pohlaví mezi sebou na první pohled lišila, např. ve zbarvení nebo velikosti těla. Podle chování a zvuku, který vydávají lze pohlaví určit až v pozdějším věku. Mláďata ptáků mají velmi podobné fenotypové znaky (pohlavní monomorfismus), nelze u nich spolehlivě rozlišit pohlaví.

Stanovení pohlaví je důležité pro sestavení chovných párů, snížení rizika přenosu nemocí, chov a ochranu ohrožených druhů, produkci brojlerů i nosných plemen slepic. Identifikace pohlaví je také důležitá pro veterinární, zdravotní i ekologické vědy. Je užitečná při prosazování legislativy a řešení sporů o otcovství (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

U ptáků (mnoha druhů hmyzu, včetně motýlů a brouků) se mohou vyskytovat jedinci tvořeni mozaikou buněk se samčím i samičím genotypem nebo fenotypem, tzv. gynandromorphové. Samčí žláza se nachází v pravé části těla, samičí pak vlevo, pravá polovina má samčí zbarvení, levá samičí. Z toho vyplývá, že pohlaví je určeno z velké míry na úrovni jednotlivých buněk. Oboupohlavní jedinci se nejčastěji vyskytují u vlhoveců rodu *Icterus*, dlasků rodu *Coccothraustes*, vrabců domácích (*Passer domesticus*), lesnáčků rodu *Dendroica*, poštolky pestré (*Falco sparverius*). (Reifová, 2013; Veselovský, 2001)

### **3.9 Tradiční metody určování pohlaví ptáků**

#### **3.9.1 Morfometrická analýza**

Morfologie je nauka o tvarech, morfometrie se zabývá měřením tvarů. Na základě geometricko-morfometrické analýzy lze také určit pohlaví ptáků. Metoda je založena na matematickém popisu a modelování, které umožňuje pochopit vznik tvarové rozmanitosti. Posuzuje se zde např.: délka zobáku, těla, křídla, běháku, hmotnost vylíhnutých mláďat v hnízdě apod. (Neustupa, 2006). Někteří dospělí ptáci mohou být sexováni podle morfometrických analýz, pokud u nich existuje vztah mezi pohlavím a velikostí těla nebo barvou peří. Přesto je aplikace morfometrických analýz složitější, pokud se velikost těla a barva peří mění mezi zeměpisnými oblastmi (Thanou *et al.*, 2013). Tyto údaje se získávají tzv. biometrickým měřením. Poté se statisticky vyhodnocují. Metoda je však nejednoznačná a nepřesná. (Neustupa, 2006)

#### **3.9.2 Laparotomie a laparoskopie**

Ptáci nemají vyvinuté zevní pohlavní orgány, podle kterých by se dalo jednoduše určit jejich pohlaví. Laparotomie a laparoskopie jsou chirurgické zákroky, při nichž se otevře tělní dutina, což umožní přímo vizuálně posoudit pohlavní žlázy vyšetřovaného jedince. Operace se provádějí v celkové anestezii. Při laparotomii může být řez veden v horní, dolní části nebo podél žeberního oblouku.

Laparoskopie je endoskopické vyšetření tělní dutiny. Laparoskop, spolu se zdrojem světla a kamerou, se zavede několika otvory přes stěnu tělní v krajině břicha do těla vyšetřovaného jedince. Kamera je propojená s obrazovkou. Tato metoda trvá kratší dobu než laparotomie i doba zotavení je poté kratší. (Lekarske.slovníky, 2008)

### 3.9.3 Zavedení sexaskopu

V roce 1951 sestrojil Japonec Kzava přístroj označovaný jako sexaskop. Princip rozlišování pohlaví touto metodou spočívá v zavedení sexaskopu do kloaky a přímém optickém posouzení pohlavních žláz (vaječníků nebo varlat) za pomoci osvětlené skleněné sondy a okuláru. Tato metoda se uplatňuje u kuřat. Jedná-li se o kohoutka, jsou sondou pozorovatelná hladká, fazolovitá, žlutá varlata. Pokud je vyšetřovaným jedincem slepička, pak lze spatřit nepravidelný, vejčitý, šedožlutý, levý vaječník s členěným povrchem. Je nutno pracovat co nejopatrněji, aby nedošlo k poranění vyšetřovaného jedince. Je to vysoce přesná metoda, avšak rychlost třídění je zde nízká (Kříž & Lazar, 1970). Vyšetření pohlavních žláz u mláďat je obtížné vzhledem k jejich malé velikosti těla. Také u dospělých ptáků mimo období rozmnožování to může být nesnadné, protože dochází k regresi *gonád*. Tato metoda se moc nepoužívá. (Fridolfsson & Ellegren, 2000)

### 3.9.4 Metody rozlišování pohlaví u jednodenní drůbeže

Pojem jednodenní drůbež znamená drůbež do stáří 48 h. V chovech produkující konzumní vejce jsou chovány pouze samice, samci jsou hned po vylíhnutí vyřazeni. Čím dříve se pohlaví od sebe oddělí, tím je to ekonomicky výhodnější.

#### 3.9.4.1 Japonská kloakální metoda, Masuiho

Jedná se o určování pohlaví dle morfologických rozdílů mezi samčími a samičími znaky v kloace kuřat, krůťat. Tato metoda vznikla v Japonsku zásluhou prof. Tokijské univerzity Dr. Masui a badatele Hashimoto. Využívala se již před několika sty lety v Číně, Japonsku a Koreji při prodeji kuřat na trzích. Do běžné praxe přešla asi v roce 1930.

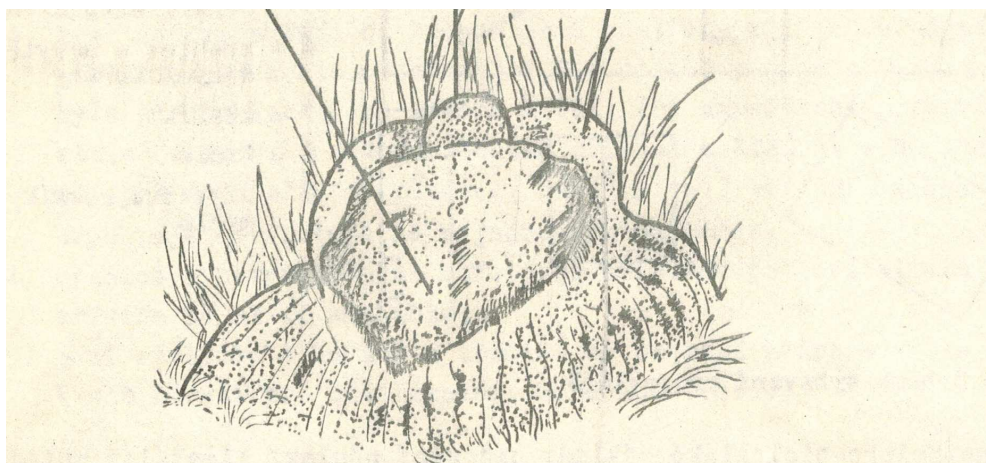
Princip spočívá v odlišném utváření části sliznice kloaky. Samci i samice mají v kloace pohlavní výčnělek. U samců se jedná o 1 mm velký rudimentární *phallus*. Povrch celého útvaru je polokruhovitý, kruhovitá základna s ostře vyznačenou rýhou v místě odstupu ze sliznice je zřetelně vymezena. Stěny pohlavního výčnělku jsou kolmé. Samice teoreticky nemají výčnělky, pravděpodobně se vytvářejí při manipulaci s kloakou. Na stejném místě jako se nalézá samčí výčnělek lze u samic nahmatat vystouplou plochu s elipsovitou základnou. Celkový tvar je jazýčkovitý, dorzoventrálně



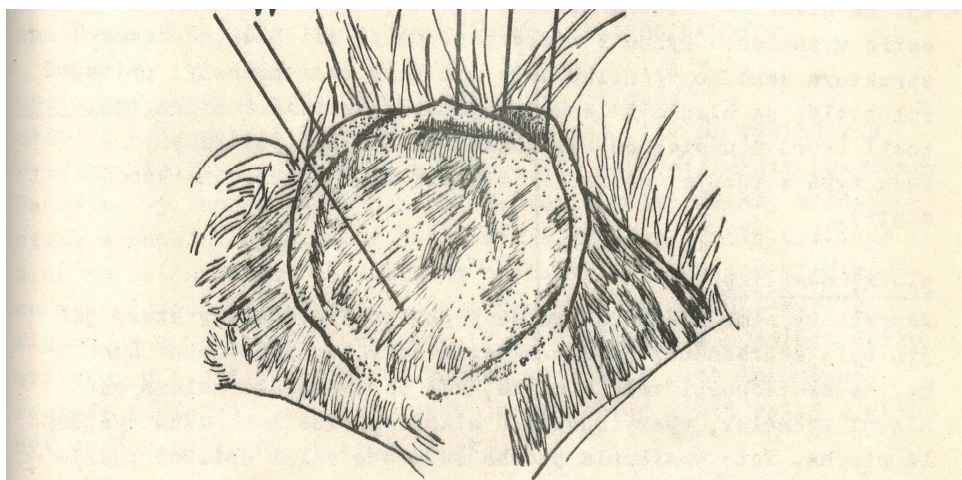
zploštělý, přechod od sliznice není výrazný. Povrch je ochablější, méně lesklý než u samců, na horní ploše svažtější.

U jednodenních mláďat vodní drubeže lze pohlaví rozlišit jednodušeji než u ostatních druhů. Rozdíly jsou zde zřetelnější. Samci mají v kloace penis, u samic se po rozevření kloaky objeví ústí vejcovodu.

Vhodné je tuto metodu provést 3–12 h po vylíhnutí, ideálně do 24 h. Nejlepších výsledků dosahují sexátoři z Japonska, kteří mají zkušenosti. Dokáží rozlišit tisíc i více kuřat za hodinu s nepřesností pouze dvou procentní. Jedná se o nejvyužívanější, nejspolehlivější metodu pro rozlišení pohlaví jednodenních kuřat ve šlechtitelských a prarodičovských chovech, hlavně u čistokrevných linií. Je to obtížněji proveditelná, subjektivní, dražší metoda, kterou mohou provádět jen zkušení odborníci s citlivým hmatem i zrakem. Hrozí zde riziko poranění kuřete nebo jeho udušení při velkém tlaku na něj. (Kříž & Lazar, 1970)



*Obr 5: Samčí kloaka; Převzato z Kříž & Lazar (1970)*



*Obr 6: Samičí kloaka; Převzato z Kříž & Lazar (1970)*

#### **3.9.4.2 Autosexing**

Autosexingové metody jsou geneticky podmíněné, využívají genů vázaných na pohlavní chromozom Z. Tyto geny nesou některé exteriérové znaky. Samice ptáků je nositelem pohlaví, uplatňuje se zde dědičnost křížem (Brouček a kol., 2011). U kuřat se pak pohlaví rozlišuje buď metodou zvanou colorsexing nebo peříčkovou metodou. Tyto metody se uplatňují na úrovni rodičovských chovů nosného typu slepic. Nevyžadují specializované odborníky ani nejsou obtížné na provedení.

#### **3.9.4.3 Colorsexing**

Colorsexing neboli barevný autosexing je metoda založená na dědičnosti barevnosti primárního peří (prachového) (Brouček a kol., 2011). Využívá se pro rozlišování pohlaví finálních hybridů nosného typu snášející hnědá vejce (Lohmann Brown, Hisex Brown, Bovans Brown, Isa Brown,...). Zbarvení určuje recesivní alela vázaná na pohlavní chromozom Z.

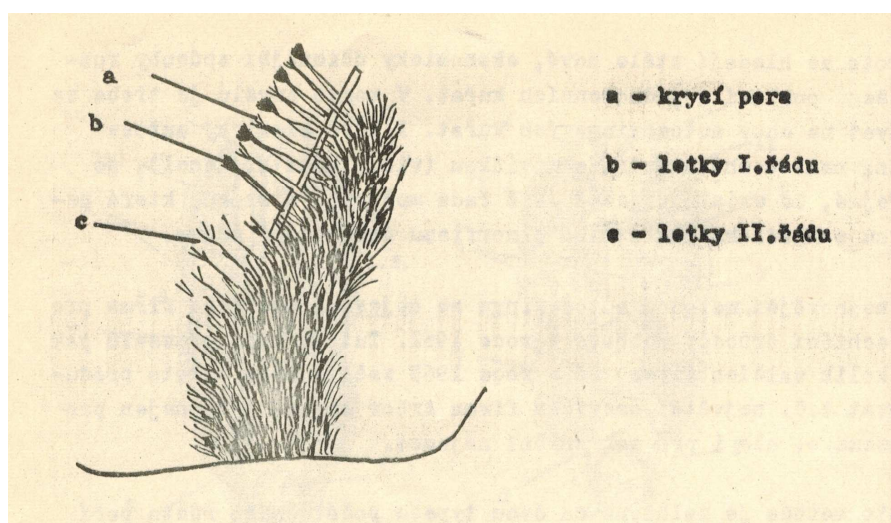
V rodičovských chovech drůbeže kříží šlechtitelské firmy plemena slepic za účelem vytvoření užitkových hybridů. Kříží např. v mateřské pozici rodajlendku bílou s rodajlendkou červenou v otcovské pozici. Rodajlendka bílá má na chromozomu Z dominantní alelu stříbřitosti „S“, která je zodpovědná za bílé zbarvení. Rodajlendka červená má na chromozomu Z recesivní alelu zlatosti „s“, která způsobuje červené zbarvení peří. Vyprodukovaní finální čtyřlinioví dvouplemenní hybridi nosného typu jsou červeně zbarvené slepičky a bílí kohoutci.

Tuto metodu pro rozlišování pohlaví na základě barvy jednodenních kuřat lze využít i u dalších plemen nosného typu jako jsou např.: sasexka světlá, hempšírka, plymutka žíhaná. Plymutka žíhaná má Bar gen vázaný na pohlavní chromozom Z. Používá se v mateřské pozici, v otcovské pak rodajlendka červená. Slepičky finálních hybridů jsou černé, kohoutci jsou černí s bílým žíhnutím na hlavě. To platí pro juvenilní peří, v dospělosti budou kohoutci žíhaní. Tento hybrid nosného typu je označován jako Moravia BSL. V ČR se rozlišuje pohlaví jednodenních kuřat na základě barvy až u 99 % hybridů nosného typu.

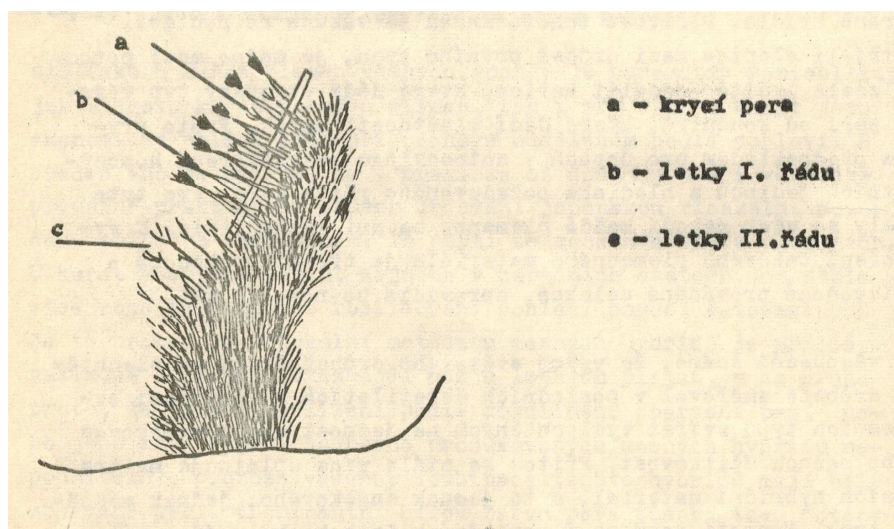
#### **3.9.4.4 Peříčková metoda**

Peříčková metoda je založená na rozdílné rychlosti opeřování (růstu letek) čerstvě vylíhnutých kuřat finálních hybridů (Brouček a kol., 2011). Jedná se o finální hybridy masného typu, finální hybridy nosného typu snášející bílá vejce (např. Dekalb White)

nebo po přehození pozic jejich rodičů při sestavování rodičovských párů, kdy nejde použít metodu colorsexing (Moravia Barred). „K“ gen způsobující zpomalení růstu peří je vázaný na pohlavní chromozom Z. U finálních hybridů se pozorují na spodní straně roztaženého křídla letky I. řádu a krovky. U slepiček se letky vyvíjejí rychleji než krovky a jsou delší. U kohoutků jsou letky stejně dlouhé nebo kratší než primární letky. Pro tuto metodu je nutné vytvoření homozygotních jedinců z hlediska požadovaného růstu peří. Pro takový to plemenný materiál se provádí několik let cílená selekce. Šlechtění těchto linií je jak časově, tak i finančně náročné. Peříčková metoda nepotřebuje speciální znalosti nutné k jejímu provedení. Je vysoce přesná a rychlá. (Kříž & Lazar, 1970)



Obr 7: Růst letek I. řádu a krycích per u autosexingových kuřat – kohoutů; Převzato z Kříž & Lazar (1970)



Obr 8: Růst letek I. řádu a krycích per u autosexingových kuřat – slepiček; Převzato z Kříž & Lazar (1970)

## 3.10 Genetické metody určování pohlaví ptáků

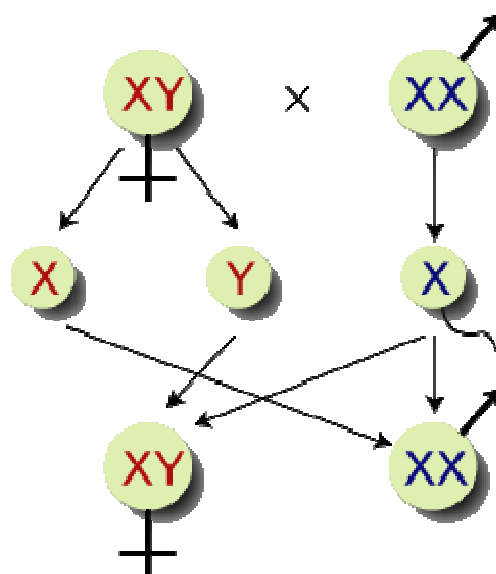
### 3.10.1 Chromozomální určování pohlaví u ptáků

O pohlaví daného jedince je rozhodnuto spojením dvou gamet a vznikem zygoty. V chromozomové sadě se vyskytují dva pohlavní chromozomy. Pokud zygota obsahuje dva pohlavní chromozomy stejného typu, jedná se o pohlaví homogametické. V případě odlišných typů těchto chromozomů se u jedince vyvíjí heterogametické pohlaví. U homogametického pohlaví jsou produkovány gamety s jedním typem pohlavního chromozomu, u heterogametického pohlaví je polovina gamet jednoho typu a druhá druhého typu (Flegr, 2009). U gonochoristů je poměr vzniklých jedinců samčího a samičího pohlaví 1:1 v každé generaci. Tento poměr je ideální z hlediska udržování genotypové variability druhu, která určuje jeho evoluční možnosti (Šmarda, 2003).

Existují dva typy chromozomálního určení pohlaví:

1. typ *Drosophila* = savčí: název odvozen od octomilky (*Drosophila melanogaster*), homogametické pohlaví XX je samičí, heterogametické XY samčí. Patří sem savci, včetně člověka, většina řádů hmyzu, některé druhy ryb, obojživelníků a plazů, dvoudomé rostliny. Řadí se sem i ploštice, včely, některé druhy rovnokřídlého hmyzu, jejichž heterogametické samčí pohlaví je určeno gonozomovou konstitucí XO, z tohoto důvodu se tvoří 50 % gamet bez gonozomu (allosomu, Y), samičí pohlaví je homogametické XX, dříve se takto určoval 3. typ tzv. *Protenor*.
2. typ *Abraxas* = ptačí: název odvozen od píd'alky angreštové (*Abraxas grossulariata*), samice jsou heterogametického pohlaví XY (ZW), jsou nositeli pohlaví, samci homogametického pohlaví XX (ZZ). Do tohoto typu se řadí ptáci, motýli, některé druhy obojživelníků a plazů, ryby, u rostlin se tento typ vyskytuje spíše vzácně, např. u jahodníku (Flegr, 2009; Šmarda, 2003).

U některých druhů, např. lumčíkovití (*Braconidae*), je pohlaví určeno interakcí několika autozomálních genů (Šmarda, 2003).



Obr 9: Chromozomální určení pohlaví – typ abraxas; Převzato z Urban (2014)

Chromozomální vyšetření se vyvinulo v průběhu času z cytogenetiky na molekulární úrovni. Identifikace pohlaví je zde založena na rozdílech v morfologii pohlavních chromozomů zjištěných pod mikroskopem. Vyšetření morfologie pohlavních chromozomů vyžaduje stanovení buněčných kultur a zastavení mitotického dělení ve stadiu metafáze, kdy jsou chromozomy dobře viditelné a oddělené. Na základě prokázání přítomnosti či absence W chromozomu či jeho specifické sekvence lze určit pohlaví neznámého jedince (Fridolfsson & Ellegren, 2000). Tato metoda se používá převážně u exotického ptactva. Ptáci mají v somatických buňkách v průměru osmdesát chromozomů a z nich ještě mnoho mikrochromozomů. Kvůli vysokému počtu chromozomů je tento způsob určování pohlaví u ptáků téměř nemožný. V praxi se cytogeneticko-molekulární metody determinace pohlaví u ptáků pro svoji finanční i pracovní náročnost a nižší spolehlivost běžně nevyužívají (Kučerová & Vodička, 2009). V současné době existují jednodušší, levnější a účinnější techniky (Fridolfsson & Ellegren, 2000).

### 3.10.2 Molekulárně biologické metody určování pohlaví u ptáků

Samice ptáků jsou heterogametického pohlaví (ZW), samci homogametického (ZZ) – pro určení pohlaví je proto nutné zjistit přítomnost W chromozomu. Geny jsou vynikající markery pro identifikaci pohlaví, protože jsou vyrobeny z funkční DNA, a proto se vyvíjejí velmi pomalu, jsou zachovány mezi různými taxony. Nejuniverzálnější marker pro určení druhu pohlaví je *CHD1* gen (*chromodomain helicase DNA binding protein 1*) (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). Molekulární

metody využívají rozdílnou délku intronu *CHD1* genu k rozlišení pohlaví u ptáků. Sekvence *CHD1* genu je přerušena intronem, který má různou délku jak u *CHD1-W*, tak u *CHD1-Z* genu (Kučerová & Vodička, 2009).

Pomocí metod molekulární diagnostiky lze vyhledávat rozdíly v sekvencích DNA, identifikovat polymorfismy v celkové genomové, chromozomové nebo mitochondriální DNA i polymorfismy specifických genů nebo jejich částí. Metody založené na analýze DNA mají 100% typovatelnost – všechny organismy obsahují DNA (Hawkes, 1998). Molekulárně biologické metody pro stanovení pohlaví u ptáků jsou téměř 100% spolehlivé. Jedná se o metody moderní, velmi citlivé, rychlé a spolehlivé. Lze je aplikovat u většiny ptačích druhů mimo zástupců pštrosovitých (Kučerová & Vodička, 2009). Jako nejvhodnější se jeví technika založená na amplifikaci *CHD1* genu, která je přesná, jednoduchá, relativně levná a rychlá a má u ptáků téměř univerzální použití. Zpracování vzorku, včetně extrakce DNA, PCR a rozlišení PCR produktů na gelu může trvat méně než pět hodin. Ostatní dále popsané techniky lze doporučit jen tehdy, když tato technika nefunguje, protože jsou pracné, časově náročné a nákladné. Analýzy na základě hybridizace DNA jsou přesné, ale relativně pomalé. V těchto metodách jsou izolované markery vázané na chromozom W často nekódující, rychle se vyvíjející sekvence. Proto, markery identifikované u daných druhů jsou velmi úzce použitelné, obvykle omezeny na jeden nebo několik blízce příbuzných druhů. Proces identifikace pohlaví může být značně dlouhotrvající, pokud se nevyužijí známé markery. Je to nutné k prověření genomické DNA při vyhledávání sekvence vázané k chromozomu W. (Dubiec & Zagalska-Neubauer; 2006; Fridolfsson & Ellegren, 2000)

### **3.10.2.1 Izolace DNA**

Při stanovení pohlaví molekulárně biologickými metodami je zapotřebí DNA. Ptačí DNA lze získat z krve, ze živých pírů s pulpami, z podskořápečných membrán (s pupeční šňůrou (krvavá žilka)) nebo z uhynulých jedinců (Genomia, 2015). Pro správné výsledky je nezbytné, aby vzorky byly kvalitní a hlavně nekontaminované buňkami jiného jedince nebo krví odběratele (Kučerová & Vodička, 2009). Nejvhodnějším biologickým materiálem, ze kterého lze izolovat ptačí DNA je krev, respektive jádra červených krvinek, která jsou zdrojem jaderné DNA. Postačí pouhá kapka krve odebraná z žíly křídla nebo nohy (v závislosti na ptačím druhu a věku) do antikoagulačního roztoku. Další možností je, že se krev nechá zaschnout na speciálním filtračním papíru, který je napuštěn směsí chemických látek lyzujících

buňky, brání růstu bakterií a chrání DNA nebo také lze použít vatovou tyčinku (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

Vhodným materiálem pro izolaci DNA jsou také živá pírka s pulpami. Z důvodu nižšího obsahu DNA se odebírá dle velikosti tři až deset živých pírek z podkřídla nebo hrudníku, cca jednu hodinu zaschlých na vzduchu. Prachové peří nemá pulpy, proto se neodebírá (Kučerová & Vodička, 2009). DNA se extrahuje z buněk z bazální špičky brku nebo z krevní sraženiny v něm.

Uhynulí jedinci (včetně mrtvých embryí) jsou fixováni v lahvičce s 96% ethanolem. DNA se získává z tkání, nejčastěji z mozku nebo jater (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). Odebrané vzorky je nutné zabalit do samostatného sáčku označeného číslem kroužku a názvem ptačího druhu. Vzorky se mohou uchovávat při pokojové teplotě, méně vhodné je vzorky zamrazovat (Bártová, 2011).

Nukleové kyseliny poprvé izoloval švýcarský lékař a přírodovědec Johannes Friedrich Miescher v roce 1869. V laboratoři je z vyšetřovaného vzorku izolována DNA ve dvou krocích:

1. extrakce – rozklad buněk (lýza) a denaturace proteinů (deproteinizace)
2. purifikace – oddělení nukleových kyselin od zbytku lyzátu.

Metody izolace mohou být založené na použití roztoků (fenol-chloroformová extrakce, proteinázová izolace, EtBr-CsCl gradientová centrifugace, alkalická extrakce) nebo pevných částic – adsorpční metody (skleněné částice, silikáty, kolonky se silikátovou membránou, magnetické částice). U kolonkové metody dochází k izolaci DNA pomocí izolační soupravy (kit), která je založena na principu adsorpce DNA na silikát. Vyšetřovaný materiál je lyzován pomocí lyzačního pufu. Buněčný lyzát je poté přenesen na izolační kolonku se silikátovou membránou, na kterou adhezuje DNA v přítomnosti chaotropních solí vyskytujících se v lyzačním pufu. Kolonka se promyje elučním pufrem, čímž se z ní uvolní DNA (Bártová, 2011).

Při izolaci fenol-organickým rozpouštědlem dochází k oddělení proteinů od nukleových kyselin, ty jsou hydrofobní a zůstávají v organické fázi, nukleové kyseliny jsou vysoce nabitě, přecházejí do vodné fáze. Centrifugací jsou pak od sebe odděleny jednotlivé fáze: spodní organická (fenol), mezifáze (denaturované proteiny, zbytky buněk), horní vodná (rozpuštěná DNA). Ethanol vysráží DNA a sediment s DNA je poté rozpuštěn ve vhodném roztoku (např. ve vodě) (Bártová, 2011). Vyizolovaná DNA je dále podrobena analýze.

### 3.10.2.2 Určování pohlaví založené na amplifikaci *CHD1* genu pomocí polymerázové řetězové reakce

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) neboli PCR je metoda, při které lze získat velké množství identických kopií vybraného úseku DNA za krátkou dobu (Šmarda *et al.*, 2005). Její výhodou je to, že umožňuje získat vybranou specifickou sekvenci genomové DNA, aniž by musela být předem naklonována ve vektorech (plasmid, fág) (Flegr, 2009). Metoda byla zavedena v roce 1985 americkým biochemikem Kary Banks Mullisem (Šmarda *et al.*, 2005).

Princip PCR reakce spočívá v replikaci nukleových kyselin. Podstatou reakce je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraného úseku dvouřetězové DNA ve směru 5' → 3' (Šmarda *et al.*, 2005). Vybraný úsek nukleotidové sekvence se vymezi dvěma PCR-primery, oligonukleotidy o délce kolem dvaceti nukleotidů (Flegr, 2009), které určují počátek syntézy. Jsou vždy dva: přímý (začátek fragmentu) a zpětný (konec fragmentu). Primery se připojí (nasedají) na protilehlé řetězce DNA tak, aby jejich 3'- konce směřovaly proti sobě. Syntéza nových řetězců probíhá na obou matricových řetězcích protisměrně. Využívají se termostabilní DNA-polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů (Taq DNA-polymeráza), aby syntéza DNA mohla probíhat opakovaně (Modernibiofyzika, 2012; Šmarda *et al.*, 2005).

Určení pohlaví ptáků metodou PCR je založeno na amplifikaci homologních sekvencí *CHD1-Z* a *CHD1-W* genů i s vloženým intronem (Kučerová & Vodička, 2009). PCR reakční směs je sestavena v mikrozkušavce (1,5 ml), pro jeden vzorek se skládá z:

- 10 µl PCR master mix (směs nukleotidů dNTP, DNA polymerázy a Mg<sup>2+</sup> iontů)
- 0,2 µl primer P2 (PP) (5'-TCTGGATCGCTAAATCCTTT-3')
- 0,2 µl primer P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3', R = A/G, Y = T/C)
- 7,6 µl voda (VFU, 2013).

Hořečnaté ionty (Mg<sup>2+</sup>) slouží jako kofaktor. Rozpustný komplex, který vytvoří s jednotlivými 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP), je rozpoznáván DNA polymerázou. Tyto ionty interagují i s dalšími činidly, proto je nutné stanovit jejich optimální koncentraci. Vysoká koncentrace některých složek směsi může způsobit tvorbu nespecifických produktů (Šmarda *et al.*, 2005).



PCR využívá jednoduchou sadu primerů k amplifikaci jak genu *CHD1-W* na W chromozomu, který je jedinečný pro samice, tak *CHD1-Z* genu na Z chromozomu, který se vyskytuje u obou pohlaví (Nesje & Røed, 2000). Při výběru nejvhodnějších s *CHD1* genem souvisejících párů primerů by se mělo začít s těmi, které již byly úspěšně použity u úzce příbuzných druhů. Pokud nejsou tyto údaje k dispozici, doporučuje se testovat jak primery P2/P8 tak 2550F/2718R primery. Pro kontrolu spolehlivosti metody by touto technikou měli být testováni i jedinci známého pohlaví (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). Primery 2550F/2718R mohou u některých druhů produkovat pouze jeden fragment u samců i samic, kvůli přednostní amplifikaci kratší kopie genu na chromozomu W. V takových případech mohou být ptáci snadno sexováni podle rozdílu ve velikosti obou amplifikovaných fragmentů. Jediný fragment obou pohlaví byl nalezen u kachnovitých (*Anatidae*), jeřábovitých (*Gruidae*), slukovitých (*Scolopacidae*) i sokolovitých (*Falconidae*) a jestřábovitých (*Accipitridae*). P2/P8 primery mohou také produkovat pouze 1 fragment u obou pohlaví. DNA sekvence u Z chromozomu je kratší než u W chromozomu a může být přednostně amplifikována. Samice pak mohou být identifikovány nesprávně jako samci. Primery P2/P8 a 1237L (5'-GAGAACTGTGCAAAACAG-3')/1272H (5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3') primery lemují stejný intron, proto je velikostní rozdíl ve fragmentech u Z a W chromozomů identický. Primery 1237L/1272H mohou produkovat větší počet nespecifických fragmentů než P2/P8, proto je vhodnější použít druhý pár primerů (P2/P8). Obecně platí, že rozdíl ve velikosti mezi Z- a W-specifickými fragmenty amplifikovanými s primery 2550F/2718R se pohybuje v rozmezí od 150-250 bp, zatímco u primerů P2/P8 od 10 do 80 bp. Proto se u některých druhů sexovaných s využitím primerového páru P2/P8 doporučuje využít k rozlišení Z a W fragmentů polyakrylamidový gel namísto agarózového, protože polyakrylamidový gel poskytuje lepší rozlišení. Například fragmenty amplifikované s primery P2/P8 nelze rozlišit na agarózovém gelu u alky chocholaté (*Aethia cristatella*). Určení pohlaví na základě P2/P8 primerů může být u některých druhů obtížné kvůli polymorfismu u Z chromozomu. Polymorfismus byl dokumentován u téměř dvaceti druhů, např. u čtyř druhů alek, sýkory koňadry (*Parus major*), šoupálka dlouhoprstého (*Certhia familiaris*) a racka západního (*Larus occidentalis*). Pro předejití těchto problémů by měly být použity primery 2550F/2718R místo P2/P8, protože lemují jiný intron, který je pravděpodobně zodpovědný za polymorfismus fragmentů u Z chromozomu (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

Dále se novou špičkou napipetuje 18  $\mu$ l PCR směsi do PCR mikrozkušavky (0,2 ml). Špičkou s filtrem se napipetují 2  $\mu$ l izolované DNA. PCR mikrozkušavka se pečlivě uzavře a vloží do termocykleru (VFU, 2013). PCR reakce probíhá v termálním cyklu (termocykler). Jedná se o programovatelný přístroj, umožňující rychle a s velkou přesností změnu teploty mezi jednotlivými kroky reakce (moderní biofyzika, 2012; Šmarda *et al.*, 2005). V rámci reakce se střídají tři kroky, které se liší pouze teplotou: denaturace, annealing a elongace. Obvykle se cyklus složený z těchto tří kroků opakuje 25–35 $\times$ . Příliš vysoký počet cyklů významně zvyšuje množství vznikajících nespecifických produktů PCR. Počet zmnožených (amplifikovaných) molekul PCR produktu teoreticky vzrůstá exponenciálně ( $2^n$ ,  $n$  = počet cyklů). Výsledkem jsou stovky milionů kopií vybraného úseku DNA. Program PCR amplifikace trvá cca 1 h 55 min:

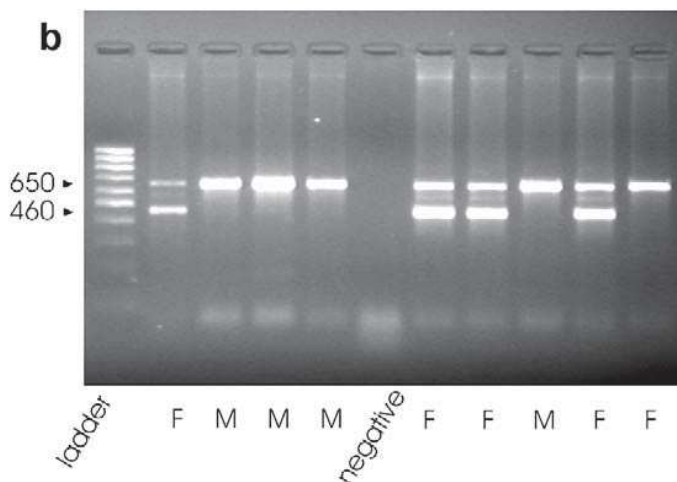
1. Denaturace – při počáteční denaturaci dochází k rozdělení jedné dvouřetězcové DNA (dsDNA) na dvě jednořetězcové (ssDNA) při teplotě 94 °C, 90 s (120–300 s). Při částečné denaturaci molekuly DNA rychle renaturují, což vede k nespecifické vazbě primerů a nesprávným výsledkům.
2. Annealing (renaturace) – nasedání primerů na specifická místa DNA při teplotě 49 °C (50–60 °C), závisí na teplotě tání primerů, 45 s (30–90 s).
3. Elongace (polymerace) – po přidání DNA-polymerázy a dNTP probíhá syntéza nových vláken na obou templátových řetězcích protisměrně, ve směru od 3'-konce primerů na základě komplementarity k původní molekule DNA (extenze). Teplota se pohybuje v rozmezí 72 °C (65–75 °C), závisí na použité DNA-polymeráze, po dobu 60 s (45–90 s).

Následuje dosyntetizování řetězců DNA (finální extenze) při 72 °C po dobu 10 min. (Flegr, 2009; Šmarda *et al.*, 2005; VFU, 2013).

Výsledným produktem PCR jsou PCR produkty (amplikony) – úseky DNA definované délkou o velikosti desítek až tisíců párů bazí, které jsou analogické restričními fragmentům. Přítomnost amplikonů v reakční směsi se prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase. Hodnotí se výtěžek a specifita PCR reakce.

Pomocí metody PCR bylo rozlišeno pohlaví u tří evropských druhů kormoránů (*Phalacrocoracidae*): kormorán malý (*Phalacrocorax pygmeus*), kormorán velký (*P. carbo*) a kormorán chocholatý (*P. aristotelis*), s využitím sady primerů

2550F/2718R pro amplifikaci *CHD1* genu. Reakce probíhala 45 minut a výsledek byl ověřen na 1% agarózovém gelu. (Thanou *et al.*, 2013)



Obr 10: Výsledek gelové elektroforézy u kormoránů při použití PCR s primery 2550F/2718R: samice (F), samec (M), velikostní standard (žebřík) 100 bp (ladder), negativní kontrola 25  $\mu$ l PCR směsi bez DNA (negative); Převzato z Thanou *et al.* (2013)

### 3.10.2.3 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza se používá k ověření výsledku PCR reakce. Slouží k separaci fragmentů DNA o různé velikosti v elektrickém poli na vhodném nosiči – gelu. Gel funguje jako molekulární síto, tvoří síťovou strukturu polymerních molekul s póry. Velikost pórů lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Gelová elektroforéza se dělí podle polohy gelu v aparatuře na horizontální a vertikální s deskovým uspořádáním, dále na kapilární elektroforézu s gelem uvnitř kapiláry. Elektroforetické gely jsou polyakrylamidové nebo agarózové. Agarózový gel je získáván z agarózy – polysacharidu z mořských řas rodu *Gelidium* nebo *Gracilaria*. Používá se při separaci molekul nukleových kyselin 100 bp–50 kb velkých. Při separaci menších molekul (10–1000 bp) je vhodnější využít polyakrylamidové gely (Bártová, 2011; VFU, 2013).

Při gelové elektroforéze je nutné nejprve připravit gel. Agarózový gel v prášku (1,2 g) se rozvaří v pufru (TBE pufr 100 ml) ve vodní lázni nebo v mikrovlnné troubě (2 min, maximální ohřev), poté se nechá zchladit pod tekoucí vodou na teplotu 50–60 °C. Množství prášku závisí na požadované koncentraci gelu a množství pufru na velikosti gelu. Nejpoužívanějšími pufrů jsou TAE (Tris-Acetát + EDTA) a TBE (Tris-Borát + EDTA), které mohou být ve formě prášku nebo roztoku. Poté se přidá

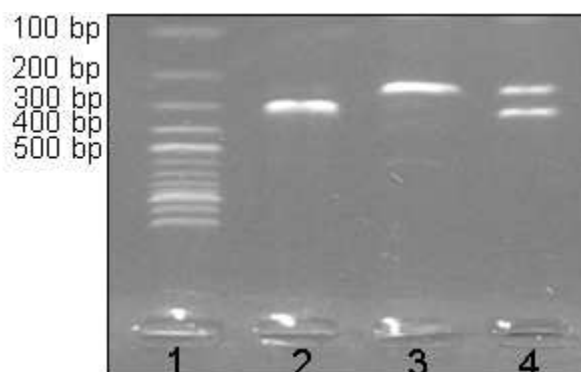
vizualizační barvivo, které se váže na DNA. Fluorescenční barvy ovlivňují mobilitu molekul. Patří mezi ně: ethidium bromid, SYBR Green, GelStar, SYBR Gold, GelGreen, SYPRO Ruby, SYPRO Orange, Midori Green atd. Mohou se přímo přidat do gelu (Midori Green 3  $\mu$ l) nebo sloužit jen k dobarvování. Směs se zamíchá a nalije do nalévací vany, do výšky cca 8mm a umístí se do ní hřebínek. Gel se nechá 30 min ztuhnout a poté se z něj vyjme hřebínek. Vanička se otočí a zalije TBE pufrem tak, aby pufr byl těsně nad povrchem gelu, musí být celý ponořený. Do vzniklých jamek v gelu se postupně pipetou nanese PCR produkty (10  $\mu$ l). Pro velikostní srovnání pozorovaných DNA fragmentů se do jedné jamky v gelu, nejlépe prostřední, nanese velikostní marker (3  $\mu$ l) o definované velikosti jednotlivých fragmentů (M50). Do vedlejší jamky se nanese směsný vzorek PCR produktu (10  $\mu$ l). Elektroforetická vana se zapojí do zdroje, pustí se elektrický proud o konstantním napětí 160 V po dobu 15–20 min. Při průchodu gelem dochází mezi molekulami nukleových kyselin a sítí polymeru ke tření. Rychlost pohybu molekul (elektroforetická pohyblivost) je závislá na velikosti molekul. Tření je větší u velkých molekul, které se díky tomu pohybují pomaleji a menší u malých molekul, které se proto pohybují rychleji. Takto jsou molekuly separovány podle velikosti. Molekula DNA je nabitá záporně, kdy nositelem záporného náboje jsou fosfátové skupiny. Z tohoto důvodu putuje vždy od – k + neboli od katody k anodě. Poté se vypne a odpojí zdroj od elfo vaničky (Bártová, 2011; VFU, 2013).

Gel se vyjme a umístí na zdroj UV světla – UV-transiluminátor. S ohledem na bezpečnost je nutné pozorovat gel přes plastový kryt. Kvalitní PCR produkt by měl být na gelu vidět jako jediný ostrý proužek. Nejčastěji se používá fluorescenční barvivo ethidium bromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bazí v DNA a vytváří s nimi komplex, který po osvětlení UV světlem červeně fluoreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA. K detekci poloh fragmentu DNA lze využít rovněž hybridizace se značenou sondou. Vizualizace nukleových kyselin v polyakrylamidovém gelu se provádí pomocí stříbra. Pokud jsou molekuly nukleových kyselin označeny pomocí radioaktivních látek:  $^{32}$ P,  $^{33}$ P,  $^{35}$ S, znázorní se polohy proužků na gelu autoradiograficky (Bártová, 2011; VFU, 2013). Velikost separovaných molekul se určuje srovnáním analyzované molekuly s tzv. hmotnostním standardem (standardem velikosti, markerem, DNA ladder/žebřík) M50 – 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp. Marker je směs fragmentů o předem známé velikosti. Většinou se jedná o restriční

fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů. Jejich velikost byla předem stanovena sekvencováním DNA. Volba konkrétního markeru závisí na očekávané velikosti separovaných molekul. Umožňují hrubou kvantifikaci nukleových kyselin (Šmarda *et al.*, 2005).

Pokud se jedná o samčí pohlaví (ZZ), dojde ke štěpení *CHD1-Z*, na gelu se objeví jeden pruh – fragment DNA, menší velikosti. U samičího pohlaví (ZW) se objeví na gelu dva pruhy, což představuje dvě kopie genu, větší pruh odpovídá neštěpenému *CHD1-W* (stejně velikosti jako neštěpený PCR produkt), druhý, menší asi 50 bp představuje *CHD1-Z*. Rozdíl v délce genu se u ptačích druhů liší. Pokud je rozdíl délky příliš malý, je hůře rozpoznatelný (Kučerová & Vodička, 2009; VFU, 2013).

V současné době některé laboratoře molekulární genetiky používají citlivější a přesnější metody analýzy DNA. Jedná se o tzv. kapilární elektroforézu, která dokáže rozlišit i velmi malý rozdíl obou kopií *CHD1* genu. Pohlaví lze poté znázornit na grafu – dva píky představují samici, jeden pík samce. Pro stanovení pohlaví pomocí této metody stačí stopové množství DNA ve vzorku. (Kučerová & Vodička)



Obr 11: Výsledek gelové elektroforézy: 1 – velikostní marker, 2 – neštěpený PCR produkt, 3 – samec, 4 – samice; Převzato z VFU.cz (2013)

### 3.10.3 Další metody určující pohlaví založené na polymerázové řetězové reakci

#### 3.10.3.1 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

Polymorfismus délky restrikčních (štěpných) fragmentů, taktéž restrikční fingerprinting neboli RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Bártová, 2011). O zavedení této metody se zasloužil britský genetik Alec Jeffreys, který v roce 1984 objevil při výzkumu DNA metodu genetické identifikace. Zjistil, že délka řetězce, počet jeho opakování i umístění ve struktuře DNA jsou pro každého jedince specifické (Hawkes, 1998). Metoda RFLP se využívá k analýze genomu jedinců téhož druhu. Její podstatou

je štěpení genomové DNA nebo její části restričními enzymy (restričními endonukleázami), které ji štěpí na specifických (restričních) místech definovaných nukleotidovými sekvencemi. Získané fragmenty DNA jsou dále odděleny podle velikosti gelovou elektroforézou. Poloha jednotlivých fragmentů je pozorovatelná použitím fluorescenčního barviva. Dle velikosti a počtu restričních fragmentů lze pozorovat rozdíly ve zkoumaných sekvencích – polymorfizmy. Polymorfismy jsou způsobeny mutacemi, které mohou způsobit vytvoření nebo ztrátu rozpoznávacích míst pro restriční endonukleázy. Mutace také vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí, delecí, inzercí nebo přestaveb ve specifických oblastech chromozomů (Bártová, 2011; Flegr, 2009; Šmarda, 2005).

Pro detekci pohlaví je nutno zjistit přítomnost či absenci pohlavního W chromozomu. W chromozom obsahuje velký podíl opakujících se (repetitivních) sekvencí, které zahrnují tandemově opakované DNA – mikro- a minisatelity. Ty mohou být použity jako pohlavně vázané markery pro detekci chromozomu W. Aby bylo možno posoudit, zda sonda vytváří samičí specifický fragment, měly být porovnány DNA profily obou pohlaví (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). Například trinukleotidová repetice (TCC)<sub>n</sub> rozliší pohlaví u holubů a kuřat. V roce 1993 testoval Longmire se svým týmem čtyři sondy: tři dinukleotidové repetice (CT)<sub>n</sub>, (GT)<sub>n</sub>, (CG)<sub>n</sub> a jednu trinukleotidovou (TCC)<sub>n</sub> u devíti ptačích druhů z šesti řádů. Nejlepší sonda (CT)<sub>n</sub> zaznamenala sekvenční specifické pro samice u šesti druhů. Zatímco dinukleotidová repetice (CG)<sub>n</sub> nezobrazila fragmenty specifické pro determinaci pohlaví u žádného z testovaných druhů. Nejčastěji se používají minisatelitní markery zahrnující sondy 33,15. V roce 1997 byl tým Miyakiho schopen identifikovat s využitím této sondy fragmenty specifické pro samice u dvaceti osmi druhů ze třiceti šesti testovaných druhů jihoamerických papoušků ze třinácti rodů. U každého druhu byla zobrazena sada fragmentů specifických pro samice, typických pro daný druh. (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006)

### ***3.10.3.2 Polymorfizmus délky restričních fragmentů u produktů polymerázové reakce***

Polymorfizmus délky restričních fragmentů u produktů PCR neboli PCR-RFLP. Jedná se o kombinaci PCR metody s následným štěpením restričními enzymy. Tato metoda je používána pro typizaci cílové sekvence (gen), která obsahuje sekvenční polymorfismus (Grimová, 2013; Šmarda *et al.*, 2005). Pokud fragmenty ze Z a W

chromozomů nevykazují rozpoznatelné rozdíly ve velikosti, ale jsou heterogenní s ohledem na nukleotidové sekvence, lze využít PCR reakci s restriktčními enzymy (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). Metodou PCR je namnožena (amplifikována) část DNA obsahující *CHD1-W* gen na chromozomu W a *CHD1-Z* gen na chromozomu Z. Výsledné PCR produkty (amplikony) jsou dále štěpeny restriktční endonukleázou (restriktázou) *HaeIII* (izolovaná z bakterie *Haemophilus aegyptius*) v restriktčním místě:



Toto restriktční místo obsahuje PCR produkt genu *CHD1-Z*, ale ne PCR produkt genu *CHD1-W*. Z tohoto důvodu se vlivem restriktázy odštěpí pouze fragment DNA z PCR produktu genu *CHD1-Z*, zatímco PCR produkt genu *CHD1-W* se neštěpí. Fragmenty jsou poté separovány gelovou elektroforézou, vizualizovány pod UV zářením a vyhodnoceny (Bártová, 2011).

Například P2/P8 primery produkují fragmenty nerozlišitelné velikosti u sluky lesní (*Scolopax rusticola*). Použití restriktčního enzymu *BshNI*, který pozná místo štěpení na W chromozomu, umožňuje spolehlivou identifikaci pohlaví. U samic se na gelu zobrazí tři pruhy, u samců jeden (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

### **3.10.3.3 Náhodná amplifikace polymorfní DNA**

Náhodná amplifikace polymorfní DNA rovněž RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), také označována jako náhodná PCR (AP-PCR). Je to jednoduchá technika fingerprinting DNA, která se používá pro rychlou srovnávací typizaci genomové DNA (Grimová, 2013; Šmarda *et al.*, 2005). Narozdíl od metody RFLP zde stačí menší množství DNA i její kvalita může být nižší, přesto bývají výsledné elektroforetogramy RAPD kvalitnější než RFLP (Flegr, 2009).

RAPD používá PCR reakci, která využívá jeden krátký náhodně vybraný deseti nukleotidový primer amplifikovaný genomovými fragmenty. Pro tuto metodu typická nízká teplota annealingu (35–40 °C) snižuje specifitu reakce a tudíž opakovatelnost výsledků. Současně nízká teplota umožňuje amplifikaci široké škály genomových fragmentů. PCR s jedním primerem amplifikuje obvykle 10–20 DNA fragmentů s různou délkou a rozdílným molárním množstvím (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). Fragmenty jsou následně rozděleny agarózovou elektroforézou a zviditelněny fluorescenčním barvivem (Flegr, 2009). Pokud se na gelu zobrazí jen jeden pruh

specifický pouze pro samice, s největší pravděpodobností se odráží sekvence spojené s W chromozomem. Z tohoto důvodu RAPD analýzy začaly s testováním několika desítek primerů, které amplifikují produkty specifické pro samice. Kvůli velkému počtu testovaných primerů, pro samice specifický produkt nemusí být vždy nalezen. Například Lessells s Matemanem nezjistili vhodné primery pro tři z deseti studovaných ptačích druhů ani po vyšetření šedesáti devíti různých primerů u jednoho druhu (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

Metoda RAPD byla vyvinuta pro studium genetického polymorfismu. Rozdíly mezi dvěma jedinci mohou být generovány autozomálně nebo jako Z chromozomální polymorfismus. Pro určení přesné pozice markeru, který je s největší pravděpodobností spojen s W chromozomem, by měl být použit souhrnný vzorek DNA, od různých jedinců stejného pohlaví. (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006)

#### **3.10.3.4 Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů**

Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů neboli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), zkráceně fragmentová analýza (Flegr, 2009). Tato metoda kombinuje PCR a RFLP. Lze využít i extrémně malé množství DNA. AFLP zahrnuje čtyři základní kroky:

1. Štěpení komplexní genomové DNA dvěma různými restrikčními endonukleázami, jedna rozpozná krátkou sekvenci, druhá delší.
2. Ligace získaných fragmentů s oligonukleotidovými adaptory navrženými tak, aby nedocházelo k obnově restrikčního místa, probíhá za přítomnosti restriktáz – nedochází ke spojování restrikčních fragmentů. Adaptory – krátké úseky DNA, se na jednom konci párují s jednořetězcovými úseky DNA (fragmenty), také obsahují vlastní sekvenci nukleotidů, na niž nasednou PCR-primery.
3. Preselektivní amplifikace s vybranými primery komplementárními k adaptorům a jednomu konkrétnímu nukleotidu v originální fragmentové sekvenci. PCR-primery jsou na konci o jeden nukleotid delší než adaptér, proto se mohou párovat s jedním ze čtyř nukleotidů fragmentu DNA. Dochází k redukci shromážděných fragmentů z původní směsi. V průměru se amplifikuje pouze každý šestnáctý fragment.
4. Selektivní amplifikace se stejnými primery jako u preselektivní amplifikace, obvykle s prodloužením o tři nukleotidy, označenými fluorescenční sondou. Ve směsi se amplifikuje v průměru pouze každý 256. fragment. Velikost



jednotlivých fragmentů ve směsi se poté zjistí kapilárovou elektroforézou v automatickém sekventátoru nebo při využití radioaktivního značení primerů lze produkty po elektroforetické separaci vystavit na polyakrylamidovém gelu. (Flegr, 2009; Šmarda *et al.*, 2005).

Na rozdíl od RAPD se nedoporučuje využití souhrnných vzorků DNA, protože PCR produkty nemusí vždy odrážet každý z jednotlivých vzorků v souhrnné DNA. Pohlavně specifické markery by měly být detekovány posouzením primerů u tří samců a tří samic ptáků individuálně. AFLP umožňuje získávat větší počet pruhů v jednom testu. To dává větší šanci detekce pohlavně specifických fragmentů (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006; Šmarda *et al.*, 2005).

U obou metod, jak u RAPD tak u AFLP, je vhodné zvolit pozitivní kontrolu – pruh nižší intenzity na gelu než fragment spojený s chromozomem W. Pozitivní kontrola je nutná k vyloučení možnosti nesprávného určení pohlaví. Taková možnost může nastat, když nejsou optimální výsledky PCR reakce, jsou neviditelné markery související s chromozomem W.

Sekvence spojené s chromozomem W nacházející se u RAPD a AFLP mohou být také použity pro návrh primerů, které jsou následně použity ve standardní PCR (sekvence charakteristické amplifikovanou oblastí, SCAR). Použití takovýchto primerů by nepochybně zjednodušilo celý proces identifikace pohlaví a jeho nákladnost ve srovnání s technikou AFLP. V tomto případě se na gelu zobrazí jeden PCR produkt – jeden pruh, charakteristický pro samice, samci budou bez pruhů, proto je zapotřebí pozitivní kontrola. Kontrolní primery by měly amplifikovat DNA fragment větší a menší intenzitou než pro pohlaví specifický fragment. (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006)

#### **3.10.3.5 Polymorfismus konformace jednořetězců**

Polymorfismus konformace jednořetězců (jednovláknové DNA) rovněž SSCP (Single-strand conformation polymorphism). Metoda se používá pro zjištění sekvenčních rozdílů mezi různými alelami na téže genu. Její princip spočívá v tom, že elektroforetická pohyblivost jednořetězců při nedenedaturujících elektroforetických podmínkách je závislá na struktuře DNA a její velikosti (Šmarda *et al.*, 2005).

Metodou PCR se připraví fragmenty DNA (PCR-SSCP). Jednořetězcové molekuly DNA se získávají z dvouřetězcových molekul jejich denaturací za použití formamidu nebo tepla. Poté se elektroforeticky rozdělí v nedeneduračním polyakrylamidovém gelu

(Šmarda *et al.*, 2005). Při elektroforéze probíhá částečná renaturace řetězců, čímž vzniká složitá, pro každý řetězec charakteristická sekundární, následně i terciální, struktura molekuly. Podle kompaktnosti této struktury doputují jednotlivé řetězce při elektroforéze různě daleko (Flegr, 2009), mají různou elektroforetickou mobilitu, čímž se rozliší polymorfní alely. Změny (mutace) se pozorují v krátkých úsecích DNA velkých 150–400 bp. Pohyblivost denaturované DNA v elektromagnetickém poli se liší podle její délky – kolik obsahuje delecí a inzercí i podle počtu substitucí. Úseky DNA lze získat polymerázovou řetězovou reakcí nebo štěpením restrikcí endonukleázami (RFLP-SSCP) (Šmarda *et al.*, 2005). Citlivost metody SSCP je vysoká, detekovatelnými změnami mobility se projeví až 90 % jednonukleotidových substitucí (Flegr, 2009).

Metoda SSCP byla použita například u jestřába Cooperova (*Accipiter cooperii*), u kterého se pohlaví nedalo přesně určit pomocí metody využívající *CHD1* gen.

#### **3.10.4 Stanovení pohlaví ptáků nadřádu běžci**

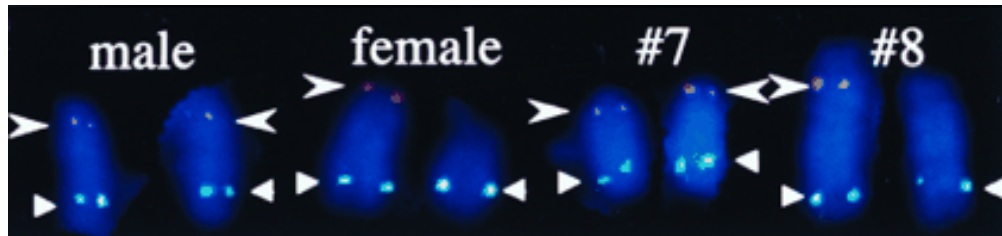
Pro stanovení pohlaví ptáků z nadřádu běžci: emu hnědý (*Dromaius novaehollandiae*) a pštros dvouprstý (*Struthio camellus*), kasuár přilbový (*Casuarus casuaris*), se vzhledem k jejich pohlavním chromozomům používá metoda FISH. Pohlavní chromozomy běžců jsou homomorfní mimo několik nepatrně odlišných regionů, které jsou používány pro stanovení pohlaví molekulárně biologickými metodami (Genomia, 2015). U pštrosa se také úspěšně využívá metoda AFLP, která zaznamenává primery navržené na základě specifické sekvence pro chromozom W (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006; Šmarda *et al.*, 2005).

##### **3.10.4.1 Fluorescenční hybridizace in situ**

Fluorescenční hybridizace in situ (Fluorescent in-situ hybridization) neboli FISH, je standardní cytogenetická metoda. Pomocí ní lze detekovat a s vysokou přesností stanovit prostorovou lokalizaci sekvence nukleových kyselin na mikroskopických preparátech (cytologických), které obsahují morfologicky zachovalé chromozomy či interfázní buněčná jádra. Metoda využívá označenou jednořetězcovou hybridizační sondu v podobě krátkého úseku DNA, která nese fluorescenční barvivo (Šmarda *et al.*, 2005).

Při teplotě 72–75 °C dochází k rozvolnění vláken DNA. Při následujícím ochlazení na 37 °C se sonda díky komplementaritě bazí naváže na cílové sekvence vyšetřované

DNA, dochází k hybridizaci. Podle místa na chromozomu, kam se sonda váže, se rozlišují čtyři typy sond: centromerické, lokus specifické sondy, subtelomerické, celomalovací (hybridizují s mnohačetnými chromozomovými sekvencemi, fluorescenčně se obarví celý chromozom). Dříve byly tyto sondy značeny radioaktivně a jejich detekce se prováděla autoradiograficky. Nyní převládá chemické značení sondy – fluorescenčně značené nukleotidy, které se vizualizují pomocí fluorescenčního mikroskopu (Šmarda et al., 2005). Nejčastěji se používají sekvenčně specifické sondy 200–300 kb velké, konjugované s fluorescenčními barvivy fluorochromy (např. SpectrumGreen, SpectrumOrange) (Genetikakv, 2011). Díky nim lze detekovat na jednom chromozomu polohy několika genů současně (Šmarda et al., 2005). Fluorescenční in situ hybridizace se dělí na jednobarevnou, dvoubarevnou či vícebarevnou (Genetikakv, 2011).



Obr 12: *In situ* hybridizované metafázní homologní chromozomy u pštrosa. Samec (male), samice (female), jedinci neznámého pohlaví (#7; #8). Převzato z Ogawa et al.; (1998)

## 4 ZÁVĚR

Ptáci jsou gonochoristé, přesto je u většiny problematické určení jejich pohlaví. Pohlavní diferenciací *gonád* je řízena geneticky a hormonálně již v embryonálním vývoji u ptáků. Znalost pohlaví je základní informace o jedinci, je důležitá pro vědecké účely, při ochraně ohrožených druhů, v chovu, znovu navracení populací do volné přírody, při snížení rizika přenosu nemocí, při prosazování legislativy a řešení sporů o otcovství.

Pohlaví ptáků lze identifikovat tradičními metodami na základě pozorování chování, morfometrickou analýzou, sexaskopem, japonskou kloakální metodou, autosexingovými metodami, laparotomií a laparoskopii. Sexuální chování lze pozorovat pouze během rozmnožovacího období a analýza morfometrických rysů nemusí být jednoznačná. Vyšetření sexaskopem nelze používat u mláďat vzhledem k malé velikosti těla. Pohlavní žlázy ptáků podléhají sezónním změnám, v období pohlavního klidu mohou být proto obtížně detekovatelné. Japonská kloakální metoda je nejvyužívanější, nejspolehlivější metodou pro rozlišení pohlaví jednodenních kuřat ve šlechtitelských a prarodičovských chovech, hlavně u čistokrevných linií. Avšak jedná se o metodu subjektivní, vyžadující zkušenosti. Autosexing zahrnuje colorsexing a peříčkovou metodu. Až 99 % nosných hybridů v České republice je rozlišováno colorsexingem. Peříčkovou metodou jsou sexováni hybridní nosného typu snášející bílá vejce a masní hybridy. Je nežádoucí obětovat několik ptáků za účelem zjištění pohlaví anatomicky, zvláště pak u ohrožených druhů.

Cytologická identifikace pohlaví je založena na rozdílech v morfologii pohlavních chromozomů. Kvůli vysokému počtu chromozomů u ptáků se dnes téměř nevyužívá. Z těchto důvodů se v dnešní době pohlaví ptáků stále častěji určuje analýzou DNA. Touto metodou lze vyšetřit mláďata ihned po vylíhnutí i dospělé jedince. Samice ptáků jsou heterogametického pohlaví (ZW) a jsou tedy nositeli pohlaví. Genetickými molekulárními metodami lze stanovit pohlaví jedince na základě přítomnosti či absence pohlavního chromozomu W nebo jeho specifické sekvence. Objev prvního ptačího genu na tomto chromozomu byl učiněn v roce 1995 a díky tomu bylo možné vyvinout přesnější metody určování pohlaví ptáků. Tímto genem je *CHD1* (*chromodomain helicase DNA binding protein 1*), který existuje ve dvou kopiích, *CHD1-Z* se nachází na Z chromozomu, *CHD1-W* na W chromozomu. Kopie genu se liší délkou intronu.

Obecně se rozdíl ve velikosti mezi Z- a W-specifickými fragmenty amplifikovanými s primery 2550F/2718R pohybuje v rozmezí od 150 do 250 bp, zatímco u primerů P2/P8 od 10 do 80 bp (194 bp u kolpíka malého (*Platalea minor*)). Metodou PCR a následnou gelovou elektroforézou pak lze u samic zjistit dva fragmenty DNA, představující *CHD1-Z* a *CHD1-W*, zatímco u samců jen jeden, představující jednu kopii genu *CHD1-Z*. Jako nejefektivnější molekulárně biologickou metodou na určení pohlaví ptáků se jeví metoda založená na amplifikaci *CHD1* genu pomocí polymerázové řetězové reakce. Je přesná, jednoduchá, relativně levná a rychlá. Zpracování vzorku, extrakce DNA, PCR a následné rozlišení PCR produktů na gelu může trvat méně než pět hodin. Ostatní popsané metody lze doporučit jen tehdy, pokud určování pohlaví založené na amplifikaci *CHD1* genu nefunguje, protože jsou pracné, časově náročné a drahé. Podle náročnosti práce a nákladnosti, by měly být použity v následujícím pořadí: RAPD, umístění mikro- a minisatelitních markerů DNA, hybridizace, AFLP. Např. metoda RAPD využívá směsný vzorek DNA od jednoho pohlaví a navzdory velkému počtu testovaných primerů nemusí být vždy pro samice specifický PCR produkt nalezen. I u AFLP metody je identifikace markerů specifických pro pohlaví obtížná, kvůli vysokému polymorfismu DNA sekvencí. Je to metoda složitá a nákladná, proto je používána velmi zřídka. U obou těchto případů je nutné zvolit pozitivní kontrolu k vyloučení možnosti nesprávného určení pohlaví. Analýzy na základě hybridizace DNA (fingerprinting) jsou přesné, ale relativně pomalé. Markery identifikované u daných druhů jsou obvykle omezeny využitím na jeden nebo jen několik blízkých příbuzných druhů. Využití známých markerů značně urychlí identifikaci pohlaví.

Pomocí metod molekulární diagnostiky lze vyhledávat rozdíly v sekvencích DNA, identifikovat polymorfismy v celkové genomové, chromozomové nebo mitochondriální DNA i polymorfismy specifických genů nebo jejich částí. Metody založené na analýze DNA mají 100% typovatelnost – všechny organismy ji obsahují. Molekulárně biologické metody pro stanovení pohlaví u ptáků jsou velmi citlivé, rychlé a spolehlivé. Lze je aplikovat u většiny ptačích druhů.

## 5 LITERATURA

- Bachtrog D., Mank J. E., Reichel C. L., Kirkpatrick M., Otto S. P., Ashman T.-L., Hahn M. W., Kitano J., Mayrose I., Ming R., Perrin N., Ross L., Valenzuela N., Amosi J. C., 2014: *Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It?* In: PLOS Biology [online], [vid. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.journals.plos.org/>
- Bártová E., 2011: *RFLP – restriční reakce*. In: VFU Brno [online], [vid. 2015-03-28]. Dostupné z: <http://mmp.vfu.cz/>
- Birdgenenames.org, 2012. *Chicken Gene Nomenclature Consortium*. In: Birdgenenames.org [online], [vid. 2015-04-23]. Dostupné z: <http://birdgenenames.org/cgnc/>
- Brouček J., Benková J., Šoch M., 2011. *Technologie a technika chovu drůbeže při splnění podmínek welfare*. In: NPPC – Centrum výskumu živočišnej výroby Nitra [online], [vid. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.cvzv.sk/>
- Černý H., 2005: *Anatomie domácích ptáků*. Metoda spol. s.r.o., Brno, 447 s.
- Dubiec A., Zagalska-Neubauer M., 2006: *Molecular techniques for sex identification in birds*. In: BIOLOGICAL LETT. 43(1): 3–12.
- Flegl J., 2009. *Evoluční biologie*. 2., opr. a rozšíř. vyd., Academia, Praha, 569 s.
- 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*. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 8147-8152.
- Fridolfsson A.-K., Ellegren H., 2000: *Molecular Evolution of the Avian CHD1 Genes on the Z and W Sex Chromosomes*. In: Genetics (Impact Factor: 4.87). 09/2000; 155(4):1903-12.
- Genetikakv, 2011: *Princip metody FISH*. In: genetikakv.cz [online], Laboratoř lékařské genetiky Karlovy Vary [vid. 2015-03-12]. Dostupné z: <http://www.genetikakv.cz/>
- Genomia, 2015: *Stanovení pohlaví ptáků*. In: Genomia genetic laboratory [online], Genomia s.r.o. [vid. 2015-03-12]. Dostupné z: <http://www.genomia.cz/>

- Genomia, 2015: *Stanovení pohlaví ptáků zástupců nadřádu běžců*. In: Genomia genetic laboratory [online], Genomia s.r.o. [vid. 2015-03-12]. Dostupné na: <http://www.genomia.cz/>
- Germonline.org, 2015: *Explore the Gallus gallus genome*. In: Germ Online [online], Germonline.org [vid. 2015-04-23]. Dostupné na: <http://www.germonline.org/>
- Ghr.nlm.nih.gov, 2015: *DMRT1*. In: Genetics Home Reference [online], Ghr.nlm.nih.gov [vid. 2015-04-23]. Dostupné na: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/DMRT1>
- Giesy J. P., Feyk L. A., Jones P. D., Kannan K., Sanderson T., 2003: *Review of the effects of endocrine-disrupting chemicals in birds*. In: Pure and Applied Chemistry 75, 2287–2303.
- Griffiths R., Korn R. M., 1997: *A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken Gallus domesticus*. In: Gene 197, 225 – 229.
- Graves J. A. M., Shetty S., 2001: *Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes*. In: J Exp Zool, 290: 449–462.
- Chue J., Smith C. A., 2011: *Sex determination and sexual differentiation in the avian model*. In: The FEBS Journal 278: 1027-1034.
- Hawkes Nigel, 1998: *Jak se to dělá? 2. vydání, Reader's Digest Výběr, Praha, 448 s.*
- Kříž L., Lazar V., 1970: *Líhnutí a určování pohlaví u drůbeže*. Ediční středisko Vysoké školy zemědělské, Brno, 120 s.
- Kučerová L., Vodička R., 2009: *Současné možnosti molekulárně-biologických metod determinace pohlaví u ptáků*. In: Nová EXOTA 4/2009.
- Lekarske.slovníky, 2008: *Laparoskopie*. In: slovníky.cz [online], Maxdorf s.r.o. [vid. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.lekarske.slovníky.cz/>
- Marvan F. et al., 2003: *Morfologie hospodářských zvířat*. Vyd. 3., Brázda, Praha, 303 s.
- Modernibiofyzika, 2012: *Moderní biofyzikální metody: pokročilé praktické vzdělávání v experimentální biologii*. In: Moderní biofyzikální metody: vzdělávání v experimentální biologii [online], Operační program vzdělávání pro konkurenceschopnost [vid. 2015-03-12]. Dostupné z: <http://www.modernibiofyzika.cz/>

- Nesje M., Røed K. H., 2000: Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers. In: *Hereditas*, 132: 261–263.
- Neustupa J., 2006: *Co je to geometrická morfometrika aneb morfologie znovu na scéně*. In: *Živa* [online], Academia [vid. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.ziva.avcr.cz/>
- Ogawa A., Murata K., Mizuno S., 1998: *The location of Z- and W-linked marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosomes of the ostrich and the emu*. In: *PNAS* 1998 95 (8) 4415-4418.
- Radevic D., 2014: *Novinky ze světa paleontologie*. In: *Wild Prehistory* [online], České paleontologické fórum [vid. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://forum.wildprehistory.org/>
- Reifová R., 2013: *Determinace pohlaví a evoluce pohlavních chromosomů*. In: *natur.cuni* [online], Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze [vid. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.web.natur.cuni.cz/>
- Smith C. A., Sinclair A. H., 2004: *Sex determination: Insights from the chicken*. In: *Bioessays*. 2004 Feb;26(2):120-32.
- Smrž J., Horáček I., Švátora M., 2004: *Biologie živočichů: pro gymnázia*. Fortuna, Praha, 207 s.
- Šípek A., 2014: Pohlavní hormony. In: *Váš zdroj informací o genetice a biologii* [online], MUDr. Antonín Šípek jr. [vid. 2015-03-20]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/>
- Šmarda J., 2003: *Genetika: pro gymnázia*. Fortuna, Praha, 143 s.
- Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J., 2005: *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno, 188 s.
- Thanou E., Biomas S., Goutner V., Lordos V., Fragedakis-Tsolis S., 2013: *Efficiency and Accuracy of PCR-Based Sex Determination Methods in the European Phalacrocoracidae*. In: *Annales Zoologici Fennici*, 50():52-63.
- Uhlenbroeková CH., 2009: *Život zvířat*. Knižní klub, Praha, 512 s.
- Urban Tomáš, 2014: *Determinace pohlaví*. In: *web2.mendelu.cz* [online], [vid. 2015-03-20]. Dostupné z: <http://web2.mendelu.cz/>
- Veselovský Z., 2001: *Obecná ornitologie*. Academia, Praha, 357 s.



VFU, 2013: *Restrikční reakce s PCR produktem, elektroforéza DNA, vizualizace a hodnocení PCR produktu*. In: VFU Brno [online], [vid. 2015-03-12]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/>

Vucicevic M., Stevanov-Pavlovic M., Stevanovic J., Bosnjak J., Gajic B., Aleksic N., Stanimirovic Z., 2012: *Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing*. In: *Zoo Biology* 32: 269–276.

Yeong-Hsiang Cheng<sup>1</sup>, Tzong-Fu Kuo<sup>2</sup>, Der-Nan Lee<sup>1</sup> a Ching-Feng Weng, 2005: *Sex Identification of the Black-faced Spoonbill (Platalea minor)*. In: *Zoological Studies* 45(1): xxx-xxx.

## 6 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr 1:	Zoologické zařazení ptáků; Zpracováno dle Uhlenbroeková (2009).....	11
Obr 2:	Karyotyp kura bankivského ( <i>Gallus gallus</i> ); Převzato z Germonline.org (2015) .....	17
Obr 3:	Gen DMRT1 je lokalizován na krátkém (p) rameni 9. chromozomu na pozici 24.3; Převzato z Ghr.nlm.nih.gov (2015) .....	21
Obr 4:	CHD-Z a CHD-W geny, délky PCR produktů u kolpíka malého ( <i>Platalea minor</i> ); Převzato z Cheng et al. (2005).....	22
Obr 5:	Samčí kloaka; Převzato z Kříž & Lazar (1970).....	25
Obr 6:	Samičí kloaka; Převzato z Kříž & Lazar (1970).....	25
Obr 7:	Růst letek I. řádu a krycích per u autosexingových kuřat – kohoutů; Převzato z Kříž & Lazar (1970).....	27
Obr 8:	Růst letek I. řádu a krycích per u autosexingových kuřat – slepiček; Převzato z Kříž & Lazar (1970).....	27
Obr 9:	Chromozomální určení pohlaví – typ abraxas; Převzato z Urban (2014).....	29
Obr 10:	Výsledek gelové elektroforézy u kormoránů při použití PCR s primery 2550F/2718R: samice (F), samec (M), velikostní standard (žebřík) 100 bp (ladder), negativní kontrola 25 µl PCR směsi bez DNA (negative); Převzato z Thanou et al. (2013) .....	35
Obr 11:	Výsledek gelové elektroforézy: 1 – velikostní marker, 2 – neštěpený PCR produkt, 3 – samec, 4 – samice; Převzato z VFU.cz (2013).....	37
Obr 12:	In situ hybridizované metafázní homologní chromozomy u pštrosa. Samec (male), samice (female), jedinci neznámého pohlaví (#7; #8). Převzato z Ogawa et al.; (1998) .....	43

## Přílohy

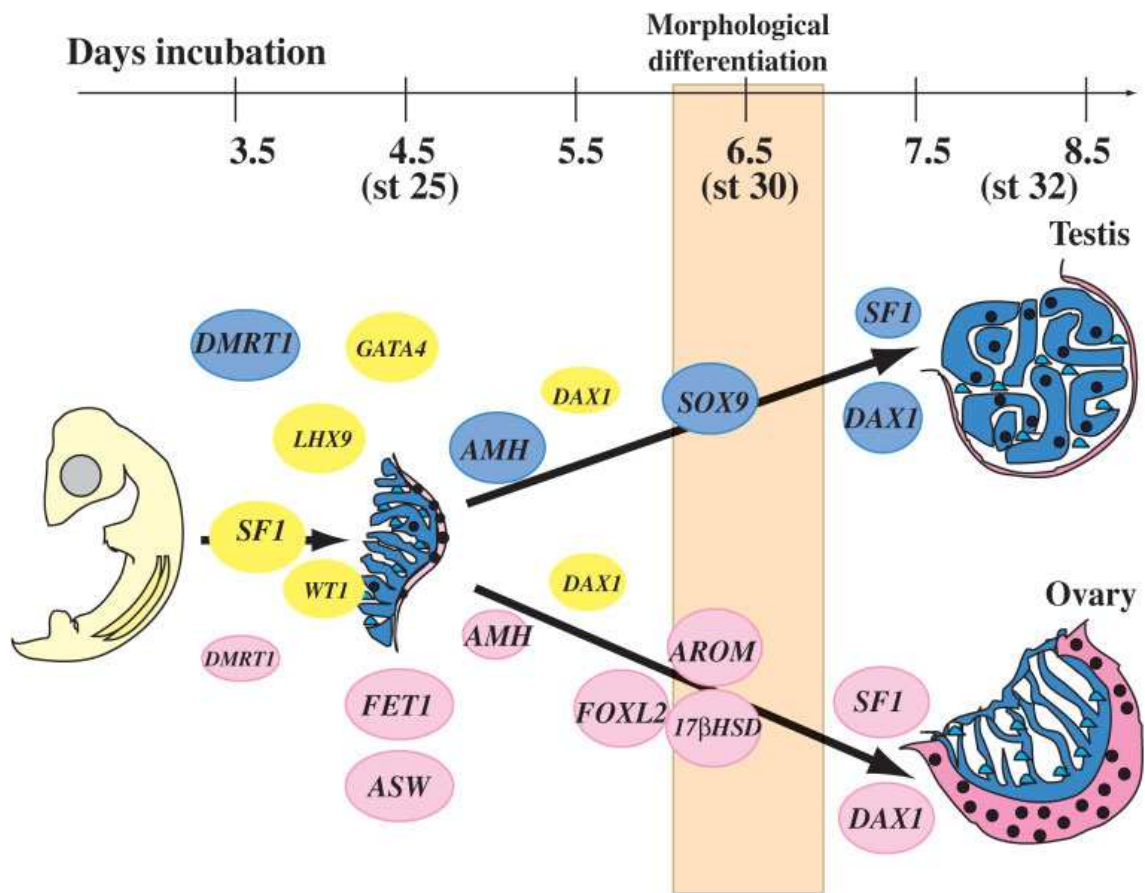
### Příloha 1:

*Porovnání ptáků a savců; Zpracováno dle Marvan et al. (2003) a Veselovský (2001)*

	<b>Ptáci</b>	<b>Savci</b>
<b>Pokryv těla</b>	peří, kůže velmi tenká, bez mazových a potních žláz	srst, silnější, mazové i potní žlázy
<b>Tělní dutiny</b>	1 – bez bránice	3 – hrudní, břišní, pánevní, bránice
<b>Kostra</b>	odlehčena a pneumatizována	centrální dutina kostí vyplněna kostní dřeví
<b>Krční obratle</b>	nejméně 11	7
<b>Hrudní, bederní, křížové obratle</b>	1. hrudní obratel volný, 2. – 5. srůst v zádovou kost, 6. volný, 7. srůst s bederními, křížovými obratli a 1. ocasním obratlem v kost synsakrum	hrudní, bederní, křížové obratle volné, křížová kost – srůst 5 křížových obratlů
<b>Ocasní obratle</b>	volné, poslední srůst v kostrč	volné
<b>Hrudní končetiny</b>	křídla, úplný pletenec, kost klíční, <i>furcula</i> , zobcovitá, srůst zápěstí a záprstí, 3 prsty	neúplný pletenec hrudní končetiny – pouze lopatka
<b>Žebra</b>	háčkovité výběžky, obratlový úsek spojen s hrudním chrupavkou	bez výběžků
<b>Hrudní kost</b>	vysoký hřeben na ventrální ploše	plochá
<b>Pánev</b>	srůst se synsakrem, výběžky stydké kosti nesrůstají	srůst výběžků stydké kosti
<b>Pánevní končetiny</b>	rudimentální lýtková kost, srůst proximální řady hleznových kůstek s nártními kostmi – běhák, 4 prsty	vyvinutá lýtková kost, kosti nesrůstají
<b>Dutina zobáková/ústní</b>	zobák bez zubů, choana, nepohyblivý jazyk	dutina ústní se zuby, nosohltan, pohyblivý jazyk

	<b>Ptáci</b>	<b>Savci</b>
<b>Jícen</b>	vole	bez volete
<b>Žaludek</b>	2 – žláznatý, svalnatý	1 – vakovitý
<b>Játra</b>	naléjají na hrudní kost, levý lalok má 2 sublaloky, pravý je celistvý	umístěna za bránicí v dutině břišní, laločnatá – druhové rozdíly
<b>Slepé střevo</b>	2 slepá střeva	1 slepé střevo
<b>Vývod pohlavní, močové, trávicí soustavy</b>	1 – kloaka	2 – močová trubice v poševní předsíni/penisu, řitní otvor
<b>Moč</b>	kyselina močová	močovina
<b>Plíce</b>	málo roztažitelné, vrostlé mezi žebry, primární, sekundární bronchy (průdušky), terciální parabronchy, vzdušné vaky	roztžitelné, uloženy v hrudním koši, 2 průdušky, průdušinky – terminální, respirační, alveoly
<b>Pohlavní soustava</b>	samčí: varlata v tělní dutině, celistvý parenchym, bez přídatných pohlavních žláz, <i>phallus</i> , kloaka	samčí: varlata v šourku mimo tělní dutinu, přídatné pohlavní žlázy, penis
	samičí: vyvinuty pouze levostranné orgány, kloaka	samičí: párové vaječníky a vejcovody, poševní předsíň, vulva, clitoris
<b>Červené krvinky</b>	s jádrem	bez jádra
<b>Zrání B lymfocytů</b>	Fabriciova burza	analogický orgán není znám
<b>Výživa mlád'at</b>	živiny ve vejci	mléko
<b>Vývoj embrya</b>	mimo tělo samice	uvnitř těla samice
<b>Pohlavní chromozomy</b>	samec: ZZ, samice: ZW	samec: XY, samice: XX

**Příloha 2:**



*Genová exprese při gonadální diferenciaci pohlaví u kuřecího embrya: modré kruhy - samčí genové exprese, růžové kruhy - samičí genové exprese, žluté kruhy - genové exprese na podobné úrovni u obou pohlaví; Převzato z Smith & Sinclair (2004)*