

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Identifikace pohlaví ptáků pomocí DNA markerů

Bakalářská práce

Autor práce: Jakub Benc

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "identifikace pohlaví ptáků pomocí DNA markerů" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10.4.2014

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval vedoucímu práce doc. Dr. Ing. Pavlovi Vejlovi a Ing. Daniele Čílové za odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady a připomínky a také jejich trpělivost, hlavně při provádění laboratorních výzkumů.

Souhrn

V bakalářské práci jsou shrnuty výsledky pilotních experimentů, zaměřených na molekulární identifikaci pohlaví u různých druhů ptáků. Pro experimenty bylo vybráno 18 druhů ptáků z pěti různých řádů. Pro optimalizaci molekulárních markerů byla použita DNA izolovaná z krční, srdeční, a žaludeční svaloviny a z jaterních buněk kura domácího, kachny domácí, husy domácí a krocana domácího. Vzhledem k mému studijnímu oboru jsem se zaměřil především na identifikaci pohlaví u exotických ptáků chovaných v klecích a voliérách.

Odběry rostoucích brků s krví se ukázaly jako vhodná neinvazivní metoda pro odběr biologického materiálu určeného k izolaci genomické DNA. Tento způsob odběru biologického materiálu je možné doporučit chovatelům se zájmem o identifikaci pohlaví ptáků. Pro genetické analýzy lze použít s úspěchem i DNA izolovanou z krevní sraženiny ve vypadlém brku. Tato sraženina se však nemusí nacházet ve všech perech. Použitý izolační kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel) se ukázal jako vhodný pro extrakci genomické DNA. Výťažnost DNA i parametry její kvality (elektroforetický test, poměry A260/A280 a A260/A230) prokázaly, že u všech vzorků byla získána vysoce čistá vysokomolekulární DNA.

Byly optimalizovány dva molekulární markery vyhodnocující délku intronů genu CHD1, které souvisí se Z a W alelami tohoto genu. Pro rychlé laboratorní určení pohlaví doporučuji použít marker 2550F – 2718R podle Fridolfsson a Ellegren (1999). U tohoto markeru je možné identifikovat rozdíly mezi gonozómy Z a W při použití agarózové gelové elektroforézy. Pro identifikaci pohlaví je možné použít rovněž marker P2 – P8 podle Griffiths (1998). U tohoto markeru doporučuji použít pro identifikaci rozdílů mezi alelami kapilární elektroforézu. Při řešení bakalářské práce byly získány sekvence ampliconů markeru 2550F – 2718R dosud necharakterizovaných druhů ptáků. Jedná se o sekvence labutě velké, husy domácí, kachny domácí, křepelky čínské, hrdličky zahradní, ary ararauny, žaka šedého, papouška mnišího, kakadu růžového, agapornise růžohrdlého a andulky vlnkované. Lze předpokládat, že získané sekvence budou v blízké době uloženy v mezinárodní nukleotidové databázi NCBI. Získaná molekulární data byla vyhodnocena pomocí fylogramů (programy ClustalX TreeView), které jednoznačně prokázaly vztah mezi sekvencemi ampliconu 2550F – 2718R a taxonomickým zařazením studovaných druhů do čeledí. Tento výsledek platil pro molekulární hodnocení obou gonozómu Z a W.

Klíčová slova: ptáci, pohlaví, gonozómy, DNA, PCR, sekvenace

Summary

The work summarizes the results of pilot experiments aimed at the molecular identification of sex in different bird species. It was selected 18 bird species from 5 different orders. DNA isolated from the throat, heart, stomach and muscle, and liver cells of chickens, domestic ducks, geese and turkey was used to optimize the molecular markers.

I focused mainly on the identification of sex in exotic birds kept in cages and aviaries due to my field of study. Growing feathers with blood were suitable for noninvasive sampling of biological material for the isolation of genomic DNA. This sampling method can be recommended to breeders interested in sex identification of birds. DNA isolated from a blood clot of plucked feathers can be successfully used for genetic analysis. This clot, however, need not be in all pens. Used isolation kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel) proved to be suitable for the extraction of genomic DNA. DNA yield and its quality parameters (electrophoretic test, ratios A260/A280 and A260/A230) showed that all samples were obtained highly pure high molecular DNA.

Two molecular markers were optimized to evaluate the length of introns CHD1 gene, which is related to the Z and W alleles of this gene. I'm recommending for quick laboratory determination of bird sex apply marker 2550F - 2718R according to Fridolfsson and Ellegren (1999). Differences between the Z and W gonosomes using agarose gel electrophoresis are very good visible. Marker P2 - P8 according to Griffiths (1998) can also be used. I'm recommending for this marker apply capillary electrophoresis. Sequences of marker 2550F - 2718R uncharacterised species of birds were obtained during my experiments. It is a sequence of *Cygnus olor*, *Anser anser f. domesticus*, *Anas platyrhynchos f. domestica*, *Coturnix chinensis*, *Streptopelia decaocto*, *Ara ararauna*, *Psittacus erithacus*, *Myiopsitta monachus*, *Agapornis roseicollis*, *Eolophus roseicapilla* and *Melopsittacus undulatus*. It can be assumed that the acquired sequences will be deposited in the near future in the international nucleotide database of NCBI. The obtained molecular data were analyzed using phylograms (programs ClustalX TreeView), which clearly demonstrated a correlation between amplicon sequences 2550F - 2718R and taxonomic classification of the species studied in families. This result is applied for molecular evaluation of both gonosome Z and W.

Keywords: birds, sex, gonosome, DNA, PCR, sequencing

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	9
2.1	Vědecké hypotézy	9
2.2	Konkrétní cíle bakalářské práce	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Determinace pohlaví diferenciací samičích a samčích jedinců u ptáků	11
3.1.1	Gonozomální determinace pohlaví u ptáků	11
3.1.2	Teorie a mechanismy genetické kontroly diferenciací pohlaví.....	13
3.1.3	Vliv genu DRMT1 na diferenciaci varlat u ptáků	16
3.1.4	Konzervovaná dráha vedoucí ke vzniku ptačích vaječníků.....	17
3.2	Morfologické rozdíly u dimorfních druhů ptáků	18
3.3	Způsoby určování pohlaví u monomorfních druhů ptáků.....	21
3.3.1	Endoskopie.....	21
3.3.2	Určování pohlaví ptáků pomocí DNA markerů.....	22
3.4	Typy genetických markerů.....	34
3.4.1	Polymerázová řetězová reakce.....	34
3.4.2	Gelová elektroforéza	35
3.4.3	Kapilární elektroforéza	36
3.4.4	Sekvenování.....	36
3.5	Modelové druhy ptáků	38
4	MATERIÁLY A METODIKA	45
4.1	Výběr modelových druhů ptáků a výchozího biologického materiálu	45
4.2	Izolace genomické DNA	49
4.3	Hodnocení kvality a kvantity izolované DNA	49
4.4	PCR marker pohlaví ptáků při použití markeru 2550F – 2718R podle Fridolfsson a Ellegren (1999).....	50
4.4.1	Podmínky amplifikace markeru.....	50
4.4.2	Detekce polymorfismů na základě gelové elektroforézy.....	51
4.4.3	Sekvence Z a W haplotipů markeru genu CHD1	52
4.4.4	Statistické a bioinformatické vyhodnocení sekvenčních polymorfismů	55
4.5	PCR marker pohlaví ptáků při použití markeru P2 - P8 podle Griffiths et al (1998) ..	59
4.5.1	Podmínky amplifikace markeru	59

4.5.2	Detekce polymorfismů na základě kapilární elektroforézy	60
5	VÝSLEDKY	62
5.1	Hodnocení kvality a kvantity izolované DNA	62
5.2.1	Výsledky elektroforetické detekce polymorfismu markeru 2550F – 2718R.....	63
5.2.2	Výsledky sekvenace markeru 2550F – 2718R	63
5.2.3	Stanovení velikosti amplikonu markeru 2550F – 2718R	77
5.2.4	Porovnání sekvence amplikonu markeru 2550F – 2718R s databází NCBI.....	78
5.2.5	Porovnání sekvence amplikonu markeru 2550F – 2718R s databází Ensembl ..	89
5.2.6	Predikce aminokyselinového složení částečné CDS stanovené na základě sekvenace markeru 2550F – 2718R.....	91
5.2.7	Konstrukce fylogramu na základě informací vyplývajících ze sekvenací markeru 2550F – 2718R.....	92
5.3	Vyhodnocení PCR markeru pohlaví ptáků při použití markeru P2 – P8 podle Griffiths et al. (1998)	105
5.3.1	Výsledky elektroforetické detekce polymorfismu markeru P2 – P8	105
5.3.2	Aplikace kapilární elektroforézy pro vyhodnocení polymorfismů markeru P2 – P8	106
5.3.3	Stanovení velikosti amplikonu markeru P2 – P8.....	109
6	DISKUZE	110
6.1	Volba výchozího biologického materiálu a metody izolace DNA.....	110
6.1.1	Biologický materiál určený pro izolaci DNA	110
6.1.2	Metody izolace DNA	113
6.2	Polymorfismus PCR markeru 2550F – 2718R.....	114
6.2.1	Metody stanovení polymorfismů PCR markeru 2550F – 2718R	114
6.2.2	Sekvenční variabilita PCR markeru 2550F – 2718R.....	114
6.2.3	Výsledky plynoucí z fylogramů stanovených na základě PCR markeru 2550F – 2718R.....	116
6.3	Polymorfismus PCR markeru P2 – P8	117
6.3.1	Metody stanovení polymorfismu markeru P2 – P8	117
6.3.2	Použití kapilární elektroforézy pro vyhodnocení polymorfismu markeru P2 – P8	117
7	ZÁVĚR	120
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	122
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	129
	PŘÍLOHY.....	130

1 ÚVOD

Určování pohlaví u ptáků, je důležité hned z několika důvodů. V přírodě se ptáci párují přirozeným výběrem partnerů, kde samci mezi sebou bojují, předvádí se před samičkami rituálním tancem či zpěvem a dokazují tak samičkám v jaké jsou fyzické kondici, avšak v záchranných programech, zoologických zahradách a hoby chovech, kde je omezený počet jedinců a tudíž i přirozený výběr, je tato přirozená součást ptačího chování značně omezena. Proto je důležité znát genetickou příbuznost a především pohlaví. Většina druhů se totiž v zajetí chová po párech a neznalost identifikace pohlaví by v tomto případě mohla být velkým problémem.

U dimorfních druhů ptáků je možné identifikovat pohlaví na základě morfologických znaků. Dimorfní druhy se od sebe odlišují několika způsoby. U některých je rozdíl patrný ve zbarvení, kde samec bývá výrazně pestře zbarven, zatímco samice je spíše nenápadná. Jiné se mohou lišit vokalizací, kde samci v období hnízdění vábí samičky na hnízdo a zároveň si tak označují své teritorium. Dále tento rozdíl může být patrný v barvě ozobí, tělesné velikosti, nebo se mohou mezi sebou lišit tvarem, velikostí a barvou zobáku, nebo například barvou duhovky.

U monomorfní druhů je však těžké odlišit samce od samice na základě morfologických rozdílů, a proto se u nich provádí vyšetření pohlavních orgánů pomocí endoskopu, nebo analýzy DNA. Endoskopie má několik nevýhod. Jedinec se při odchytu stresuje, dále pak podstupuje anestezii a nakonec dochází k samotnému zákroku, kde se pomocí laparoskopu zjišťuje přítomnost samčích, nebo samičích pohlavních orgánů. Metoda DNA je daleko citlivější, protože je k ní zapotřebí jenom malé množství DNA. Jako vzorek nám postačí kapka krve, nebo čerstvě vypadlé brko.

2 Cíl práce

2.1 Vědecké hypotézy

Řešení bakalářské práce je postaveno na následujících vědeckých hypotézách:

- U ptáků jsou známy sekvence genů, které jsou lokalizovány na gonozómech Z a W. Jedná se o takové geny, u kterých existuje sekvenční polymorfismus mezi alelami lokalizovanými na gonozómu Z a W.
- Gen CHD1 byl u ptáků lokalizován na gonozómech Z a W. Rozdíl mezi alelami tohoto genu byl popsán u řady ptačích druhů. Tento rozdíl je způsoben velikostí některých intronových oblastí. Lze předpokládat, že i u druhů, které budou použity v bakalářské práci, budou existovat obdobné délkové polymorfismy intronů.
- Gelová a kapilární elektroforéza představuje vhodný nástroj pro detekci délkových polymorfismů. Kapilární elektroforéza je vhodná pro odlišení fragmentů s menšími rozdíly ve velikostech.
- Sekvenční analýzou lze jednoznačně stanovit polymorfismy amplikonů na bázi substitucí a delecí. Pomocí této analýzy lze jednoznačně určit i velikosti amplikonů.
- Lze předpokládat, že existují vztahy mezi sekvencemi amplifikovaných oblastí a mezi taxonomickým zařazením studovaných druhů. U získaných dat lze tudíž předpokládat jejich vhodnost pro bioinformatické vyhodnocení.

2.2 Konkrétní cíle bakalářské práce

Z výše uvedených vědeckých hypotéz vyplývají konkrétní cíle bakalářské práce. Tyto cíle je možné shrnout do následujících bodů:

1. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na molekulární detekci pohlaví u ptáků.
2. Vybrat modelové druhy ptáků, u kterých se bude provádět analýza pohlaví pomocí DNA markerů.
3. Vybrat typ výchozího biologického materiálu a metodu izolace genomické DNA. Provést extrakci DNA u hodnocených vzorků.
4. Optimalizovat PCR markery charakterizující gen CHD1 lokalizovaný na gonozómech Z a W.
5. Provést sekvenaci vybraných markerů a získané sekvence porovnat s mezinárodními nukleotidovými databázemi.
6. Vyhodnotit vztah mezi sekvenčními polymorfismy markerů hodnocených druhů ptáků a mezi jejich taxonomickým zařazením.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Determinace pohlaví diferenciací samičích a samčích jedinců u ptáků

Ptáci patří mezi typické zástupce živočichů s odlišením samčích a samičích jedinců. Jedná se o takzvané gonoforistické druhy.

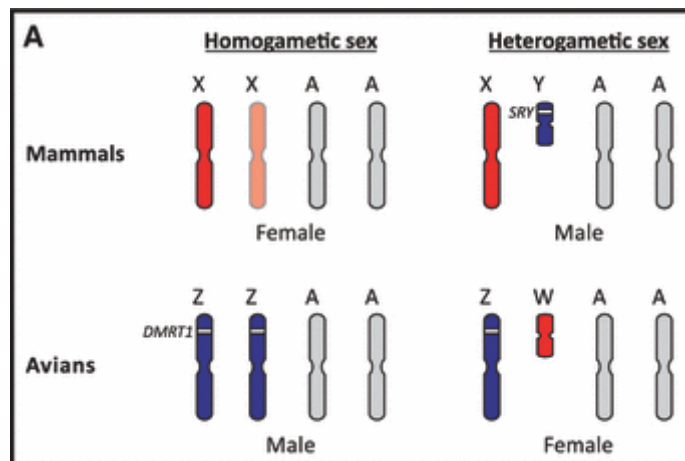
3.1.1 Gonozomální determinace pohlaví u ptáků

Chue a Smith (2011) uvádějí, že pohlaví ptáků je primárně určeno pomocí genů lokalizovaných na páru pohlavních chromozómů. Dědičností pohlavních chromozómů (ZZ u samce a ZW u samice). Barske a Capel (2008) uvádějí, že u ptáků a savců dochází k determinaci pohlaví po oplození, kdy pro následný vývoj zygoty a její diferenciaci je klíčová kombinace výše uvedených gonozómů. Guiguen et al. (2009) považují diferenciaci pohlaví za klíčový proces v evoluci pohlavního rozmnožování. Výše citovaní autoři zdůrazňují, že diferenciaci je důsledkem genetické a hormonální regulační dráhy. Chue a Smith (2011) uvádějí, že u ptáků i savců existují dva odlišné gonozómy (ZW respektive XY). Podle těchto autorů je však obtížné hledat podobnosti mezi funkčními geny gonozómů savců a ptáků. Tito autoři vyslovili hypotézu, že pár gonozómů u ptáků se vyvinul během evoluce z jiného páru autozómů než u savců. Chue a Smith (2011) jako důkaz této teorie uvádějí to, že na gonozómech ptáků není lokalizován gen SRY, který hraje klíčovou roli v determinaci varlat u vačnatců a placentárních savců. Gen SRY je u této skupiny obratlovců lokalizován na gonozómu Y.

Hiller et al. (2004) uvádějí, že vhodným modelem při determinaci pohlaví u ptáků je kur domácí (*Gallus gallus f. domesticus*). Důvodem je to, že v současné době je u tohoto ptačího druhu k dispozici kompletní sekvence jeho genomu.

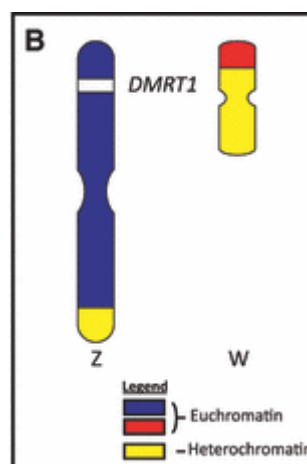
Geny umístěné na jednom nebo na obou pohlavních chromozómech kontrolují pohlavní diferenciaci během embryonálního vývoje, kdy dochází k tvorbě varlat u samců (ZZ) a vaječnicků u samic (ZW). Rozdíly mezi velikostmi pohlavních chromozómů mezi savci a ptáky jsou patrné z následujícího obrázku 1.

Obrázek 1: Rozdíly mezi gonozómy ptáků a savců – upraveno podle Chue a Smith (2011)



Předpokládá se, že geny zodpovědné za determinaci pohlaví se exprimují nejen v pohlavních žlázách, ale rovněž v ostatních buňkách těla. Tento jev způsobuje, že buňky vyvíjejícího se embrya ovlivní další diferenciaci gonád na vaječníky, nebo varlata. Chue a Smith (2011) popisují rozdíly mezi ptačími gonozómy W a Z. Uvádějí, že Z gonozóm je u všech ptačích druhů výrazně větší a lze předpokládat, že obsahuje menší množství heterochromatinových oblastí. Z pohledu exprese genů je možné tento chromozóm považovat za geneticky aktivnější. Na gonozómu Z je lokalizován rovněž gen *DMRT1*, který je zodpovědný za determinaci varlat. Naopak gonozóm W je u ptáků výrazně menší a je tvořen zejména heterochromatinovými oblastmi. Rozdíly mezi gonozómy Z a W u ptáků, jsou znázorněny na následujícím obrázku 2.

Obrázek 2: Rozdíly mezi gonozómy Z a W u ptáků – upraveno podle Chue a Smith (2011)



Chue a Smith (2011) předpokládají, že u modelového kura domácího mají gonády v prvních etapách embryonálního vývoje dipotencionální charakter. To znamená, že morfologické znaky diferenciac gonád na vaječníky, nebo varlata jsou patrné přibližně v šestém dnu embryonálního vývoje. Tito autoři za embryonální vývoj kuřete považují období 21 dnů, kdy probíhá vývoj embrya ve vejci. V tomto období se začínají projevovat rozdíly ve vývoji gonád u samčích a samičích embryí. U samčích embryí se Sertoliho buňky diferencují na vnitřní část – (medula) a vnější kortex zaniká. Naopak u samičích embryí dochází ke ztloustnutí kortexu a vakuolizaci meduly. Výše popsany vývoj probíhá u levého vaječníku. Naopak u pravého vaječníku se nevytváří ztloustlý kortex.

3.1.2 Teorie a mechanismy genetické kontroly diferenciac pohlaví

Řada autorů se pokusila vysvětlit genetické a biochemické mechanismy, které mohou způsobit odlišný vývoj gonád s bipotenciálním charakterem. Chue a Smith (2011) rozdělují tyto teorie na dvě skupiny:

- 1) Teorie založená na dávkce genů lokalizovaných na gonozóm Z
- 2) Teorie dominantního účinku genů lokalizovaných na gonozómu W

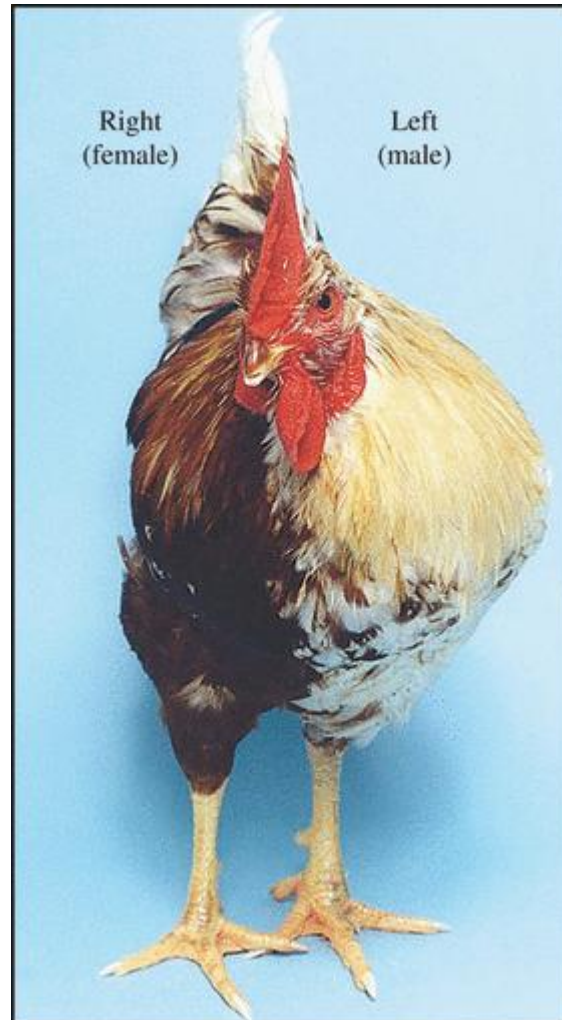
Teorii dominantního účinku genů lokalizovaných na gonozómu W popisují například Clinton (1998) a Smith et al. (2007). Tito autoři se domnívají, že na gonozómu W, který je charakteristický pro samice, se nachází dominantně aktivovaný gen, kódující determinant, vedoucí k diferenciaci vaječníku.

Teorii efektu dvojnásobné dávky genů lokalizovaných na gonozómu Z vedoucího k diferenciaci samčího pohlaví vysvětlují například Smith et al. (2009) a Nanda et al. (2008). Tato teorie je v současné době považována za více pravděpodobnou při vysvětlování diferenciac pohlaví ptáků.

Chue a Smith (2011) uvádějí, že studie vývoje a determinace pohlaví u ptáků může vyvrátit tradiční pohled na diferenciaci pohlaví u obratlovců. Tato teorie předpokládá, že během embryonálního vývoje se diferencují gonády na vaječníky a varlata. Vaječníky a varlata jsou potom zodpovědné za produkci hormonů, které ve finále vedou k diferenciaci typických tělesných znaků samců a samic. Zhao et al. (2010) uvádějí, že vhodným modelem pro studium diferenciac je model gynandromorfního kura domácího. Tito jedinci jsou osově

souměrní a jsou tvořeni z jedné poloviny samčím a z druhé poloviny samičím jedincem. Typické znaky gynandromorfního jedince jsou patrné na obrázku 3.

Obrázek 3: Gynandromorfní jedinec kura domácího – upraveno podle Zhao et al. (2010)



Z obrázku je patrné, že samčí polovina jedince má výrazně vyvinutější prsní svalovinu, ostruhu na jedné noze a výrazný lalůček. U samičí poloviny je naopak prsní svalovina méně vyvinuta, na končetině chybí ostruha a lalůček je výrazně menší. Zhao et al. (2010) uvádějí, že u takového jedince přibližně polovina buněk obsahuje gonozómy ZZ a druhá polovina buněk gonozómy ZW. Takového jedince je možné označit, jako sexuální mozaiku. Příčinu vzniku této sexuální mozaiky je podle Zhao et al. (2010) nutno hledat v nesprávně fungující meiózy u matky tohoto jedince, kdy došlo k chybnému vydělení pólového tělíška během oogeneze. Zhao et al. (2010) předpokládá, že diferenciaci odlišných polovin gynandromorfa musí být spuštěna přímo na základě kombinace gonozómů v jednotlivých buňkách. Tito autoři předpokládají, že buňky s kombinací gonozómů ZZ a ZW

si „dokáží pamatovat“, v jaké pohlaví se mají vyvinout. To znamená, že látky hormonální povahy, které u gynandromorfa produkuje obrácená polovina těla, neovlivní diferenciaci pohlaví. Existence gynandromorfismu u ptáku lze považovat za důkaz, že pro vývoj samčího, nebo samičího pohlaví, jsou důležité jednotlivé genetické faktory, které jsou synchronizovaně aktivní v každé buňce. Z obrázku gynandromorfa je patrná osová symetričnost. To znamená, že samčí a samičí buňky se u tohoto jedince během embryonálního a postembryonálního vývoje „nepromísí“. Tento jev Zhao et al. (2010) označuje termínem, že nedochází k integraci buněk. Tito autoři rovněž popisují experimenty založené na transplantaci buněk u ptáků mezi jedinci různého pohlaví, které také způsobují absenci integrace buněk. Koo et al (1985) vysvětlují příčinu těchto jevů na základě tvorby specifických protilátek u samců a samic ptáků. Chue a Smith (2011) upozorňují však na to, autoři zabývající se studií gynandromorfních ptáků, nepovažují za významný vliv steroidních hormonů (testosteron a estrogen), při diferenciaci pohlaví. Chue a Smith (2011) uvádějí, že kromě přímého efektu genů musí při diferenciaci pohlaví hrát důležitou roli i hormony. Význam hormonů při diferenciaci ptačího embrya potvrdili například Elbrecht a Smith (1992) a Vaillant et al. (2001). Tito autoři pracovali s embryi kuřat, u kterých byla vyblokována funkce enzymu aromatázy, který je nezbytný pro syntézu estrogenu. Tito autoři pracovali s kuřecími embryi genotypu ZW. To znamená, že z hlediska karyotypu se jednalo o samičí embrya. Pokud byla funkce aromatázy vyblokována v rané fázi embryonálního vývoje, potom se u těchto samic gonády vyvíjely jako varlata.

Autoři zabývající se studii gynandromorfních ptáků předpokládají, že rozdíly mezi samci a samicemi ptáků v tělesné stavbě budou způsobeny zřejmě dvojitou dávkou gonozómu Z u samčích jedinců. Chue a Smith (2011) předpokládají, že u každého jedince bez ohledu pohlaví vzniká vždy alespoň jeden kranskryptom gonozómu Z. U samců vznikají kranskryptomy dva oproti jednomu kranskryptomu samic. Lze totiž předpokládat, že proteiny kódované gonozómem Z, vznikají u samců ve dvojnásobném množství oproti samicím. Tento rozdíl může být zodpovědný za znaky pohlavního dimorfismu. Na rozdíl od savců, kde je jeden gonozóm X u samic přeměněn na Baarovo tělísko. U ptáků ke kompenzaci dvojitě dávkou gonozómu Z nedochází (Melamed a Arnold 2007).

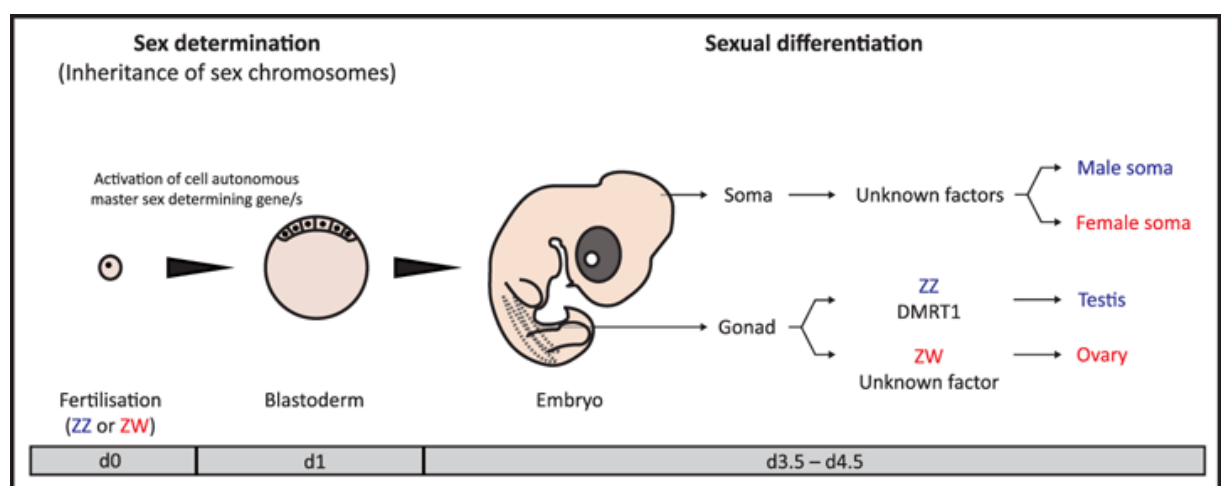
Chue a Smith (2011) uvádějí, že existují rovněž druhy ptáků, kde mezi gonozómem Z a W existují minimální rozdíly z hlediska jejich velikost i z hlediska rozložení chromatinových a euchromatinových oblastí. Tento jev je charakteristický pro řád pštrosi (*Struthioniformes*), naopak u létavých ptáků jsou patrné velikostní rozdíly mezi gonozómy

Z a W. Jestliže u pštrosů je předpokládán vznik téměř identických transkriptomů gonozómů Z a W pro diferenciaci samčího a samičího pohlaví, nebudou zřejmě důležité dávky celých gonozómů Z, ale zřejmě důležitou roli budou hrát pouze některé geny specifické pro Z a W gonozómy (Chue a Smith, 2011).

3.1.3 Vliv genu DRMT1 na diferenciaci varlat u ptáků

Chue a Smith (2011) uvádějí, že u kura domácího je popsáno přes 680 známých genů kódujících známé proteiny, 49 nových genů a přibližně 45 sekvencí pro RNA nekódující proteiny. Tito autoři předpokládají, že teoreticky kterýkoliv z těchto genů může hrát důležitou roli při diferenciaci gonád. Za favorita mezi kandidátními geny je považován gen DRMT1 z důvodu značné sekvenční podobnosti napříč obratlovci a současně z důvodů vyšší exprese samčích genů oproti samičím. Úloha genu DRMT1 při diferenciaci pohlaví, byla studována rovněž i u savců, plazů a ryb (Smith et al., 1999 a Raymond et al., 1999). U ptáků se gen DRMT1 nachází pouze na gonozómu Z. Na gonozómu W se gen DRMT1 nenachází. Toto zjištění platí i pro řád pštrosy. Chue a Smith (2011) uvádějí, že gen DRMT1 kóduje transkripční faktor se zinkovými prsty, který funguje jako doména se schopností vázat se na molekuly DNA. Tito autoři předpokládají, že v gonádách které se diferencují na varlata, dochází k vyšší expresi tohoto genu. Na následujícím obrázku 4. je znázorněno schéma diferenciaci kuřecího embrya včetně vlivu genu DRMT1.

Obrázek 4: Determinace pohlaví a sexuální diferenciaci u kuřecího embrya – upraveno podle Chue a Smith (2011)



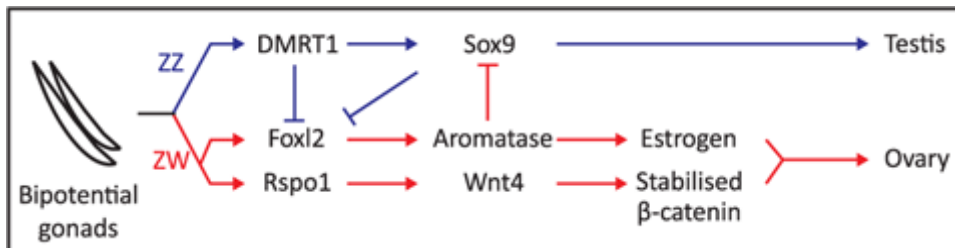
Chue a Smith (2011) si kladou otázku, zda gen DRMT1 je skutečně tím jediným a důležitým genem pro diferenciaci pohlaví ptáků. Na tuto otázku nalézají následující odpověď. Gen DRMT1 může hrát klíčovou roli, pro diferenciaci gonád, ale pro diferenciaci dalších buněk, respektive tkání a orgánů klíčovou roli hrát nebude. Zhao et al. (2009) provedli řadu experimentů založených na transformaci prekurzorových gonádových buněk mezi jedinci různého pohlaví. Pomocí těchto experimentů studoval vliv exprese genů na diferenciaci pohlaví. Chue a Smith (2011) došli k závěru, že gen DRMT1 je zodpovědný za vývoj varlat a že s velikou pravděpodobností bude hrát důležitou roli během diferenciaci jednotlivých buněk ve varlatech. Tito autoři vyslovili hypotézu, že proteinový produkt genu DRMT1 aktivuje další geny, jako je gen SOPS9, který rovněž vede k diferenciaci varlat. Tyto výsledky doložili studii exprese obou genů, kdy gen DRMT1 je exprimován již za třiapůl dne od začátku inkubace slepičích vajec a gen SOX9 je exprimován až po šesti dnech inkubace. Tito autoři rovněž předpokládají, že dvojnásobná dávka proteinu kódovaného genem DRMT1 může způsobovat inhibici takzvané samičí diferenciacní dráhy, vedoucí ke vzniku vaječnicku.

3.1.4 Konzervovaná dráha vedoucí ke vzniku ptačích vaječnicků

Již v úvodu této kapitoly literární rešerše byla nastíněna hypotéza, že na gonozómu W se mohou nacházet geny, které budou naopak zodpovědné za diferenciaci vaječnicků. Chue a Smith (2011) tuto teorii přirovnávají k účinku genu SRY u savců, který je lokalizován na heterogonozómu Y a je považován za významný při diferenciaci savčích varlat. Saitoh et al. (1991) a Chue a Smith (2011) dospěli k závěru, že hledání kandidátních genů zodpovědných za diferenciaci vaječnicků u ptáků lokalizovaných na gonozómu W bude poměrně obtížné. Důvodem této obtížnosti je zejména vysoké zastoupení heterochromatinových sekvencí na gonozómu W. Gonozóm W je rovněž charakteristický častým výskytem repetitivních sekvencí. Tito autoři dospěli k závěru, že mechanismus diferenciaci vaječnicků u ptáků na základě genů lokalizovaných na gonozómu W není zcela jasný. V procesu diferenciaci se zřejmě mohou účastnit geny FOXL2 a RSO1. Gen FOXL2 byl studován v souvislosti s diferenciací vaječnicků jak u ptáků, tak u savců. Jedná se o konzervované sekvence a lze tudíž předpokládat obdobný účinek při vzniku vaječnicků u různých obratlovců. Hudson et al. (2005) dospěl k závěru, že gen FOXL2 bude v kuřecích embryích ovlivňovat tvorbu enzymu aromatázy, která je nezbytná při biosyntéze estrogenu. Gen RSO1 kóduje vznik proteinu R – spodin 1. Smith et al. (2008) uvádí, že v kuřecích embryích je gen RSO1 exprimován zejména v oblasti kortexu gonád a naopak gen FOXL2 je exprimován zejména v oblasti meduly. Chue a Smith (2011) předpokládají, že geny DRMT1, FOX2 a RSO1 budou hrát klíčovou roli

v kaskádě biochemických a fyziologických procesů vedoucích k diferenciaci varlat a vaječníků ptáků. Hypotéza o účinku těchto genů je znázorněna na následujícím obrázku 5.

Obrázek 5: Molekulární hypotéza u rolí genů DRMT1, FOXL2 a RSO1 při diferenciaci gonád ptáků – upraveno podle Chue a Smith (2011).



3.2 Morfologické rozdíly u dimorfních druhů ptáků

Pohlavní dimorfismus, (pohlavní dvojtvárnost) znamená, že se samec odlišuje od samice. Tyto rozdíly jsou patrné ve zbarvení, velikosti nebo jiných znacích, které jsou typické pro určité druhy ptáků. V následující části literární rešerše se zaměřím zejména na druhy cizokrajných ptáků, které jsou chovány v klecích a voliérách chovatelů. Důvodem zaměření je obor mého bakalářského studia.

Barva opeření

Existuje jen málo druhů ptáků, u kterých je rozdíl v barvě opeření mezi pohlavími tak nápadný (Verhoef, 2006). Tento rozdíl se může lišit během ročního období. V období toku jsou samci nejvíce vybarvení, zatímco mimo hnízdní období jim některý tyto znaky chybí. Příkladem může být kachna divoká, kde se v období pelichání liší samec od samice pouze ve zbarvení zobáku (Bouchner, Procházka, 1997). Bouchner a Procházka (1997) se domnívají, že u některých druhů ptáků, kde samice hnízdí v dutině, není tak velký rozdíl mezi pohlavími, jako u druhů hnízdících na zemi, nebo v hnízdech. Bouchner a Procházka (1997) uvádějí, že zbarvení samic hnízdících na zemi působí jako mimikry, které je tak chrání před predátory.

Mezi cizokrajnými ptáky chovanými v klecích a voliérách lze nalézt řadu příkladů pohlavního dimorfismu vyplývajícího z barvy opeření. V následujících řádcích popisují některé druhy, u kterých je rozdíl v opeření nejvíce odlišný. U řádu vrubozobí jsou znaky pohlavního dimorfismu charakteristické pouze pro některé rody. Například u rodu *Cygnus*, *Anser*, *Branta*, neexistují rozdíly ve zbarvení peří. Naopak u některých zástupců husic (rod *Chloephaga*), existují nápadné rozdíly mezi zbarvením samice a samce. Výrazný pohlavní dimorfismus je naopak charakteristický pro rod *Anas* (Veger a Kamínek, 1980).

Výrazný pohlavní dimorfismus založený nejen na zbarvení peří, ale i na specifickém utváření ocasních per a ocasních krovek je charakteristický pro řád hrabaví (*Galliformes*). Tyto znaky jsou patrné zejména pro rody (*Syrnaticus*, *Chrysolophus*, *Gennaesus*, *Crossoptilon*, *Lophohoprus*, *Tragopan*, *Pavo*, *Galus*, *Meleagris*). Znaky pohlavního dimorfismu jsou patrné i u domestikovaných forem některých výše uvedených rodů. Přesto i u řádu hrabaví (*Galliformes*) lze nalézt druhy, u kterých nejsou dobře patrné znaky pohlavního dimorfismu založené na zbarvení peří. Příkladem může být perlička kropenatá (*Numida meleagris*), (Veger a Kamínek 1980).

Pro řád měkkozobí (*Columbiformes*) je naopak charakteristická absence pohlavního dimorfismu založeného na zbarvení peří (Verhoef – Verhallenová, 1990). U řádu papoušků *Psittaciformes* lze nalézt řadu typických druhů s výrazným pohlavním dimorfismem. Typickým příkladem je eklektus různobarvý (*Eklektus roratus*). U tohoto druhu existuje kolem deseti poddruhů. Rozdíly mezi nimi jsou patrné zejména u samic (Alderton, 2002). Unikátním znakem je zbarvení samce a samice. Rozdíl mezi nimi je tak velký, že ještě donedávna byli považováni za dva odlišné druhy (Kooten, 2010). Samec je u tohoto druhu převážně zelený, zatímco samička je červená. Dalším typickým druhem s pohlavním dimorfismem je agapornis šedohlavý (*Agapornis canus canus*). Tento druh agapornise jak z názvu vyplývá, je odlišný ve zbarvení hlavy. Samička je téměř celá zelená, zatímco sameček je zelený s šedou hlavou (Abeele, 2006). Znaky pohlavního dimorfismu je možné nalézt rovněž u korely chocholaté (*Nyphycus molladicus*) u všech zástupců rodu alexander (*Psittacula*). Znaky pohlavního dimorfismu jsou charakteristické pro některé australské papoušky rodů (*Polytelis*, *Psephotus*, *Aprosmictus* a *Neophema*).

U čeledi pěnkavovitých (*Fringillidae*) je pohlavní dimorfismus dobře vyjádřen u čížka ohnivého (*Carduelis cucullata*) a u některých zástupců rodu (*Volantinia* a *Passerina*). U kardinálů jsou naopak znaky pohlavního dimorfismu obvykle nevýrazné (Verhoef – Verhallenová, 1990, Veger 1988, Dienstbier, 1980). U skupiny astrildů a amadin lze rovněž nalézt řadu příkladů výrazného pohlavního dimorfismu založeného na zbarvení peří. Typickými příklady jsou zástupci rodu (*Lagunostica* a *Pytilia*). Znaky pohlavního dimorfismu lze nalézt rovněž u amadiny páskované (*Amadina fasciata*), amadiny černošedé (*Amadina erythrocephala*), amady gouldové (*Chloebia gouldiae*), zebříčky pestré (*Taeniopygia guttata*). U některých druhů je typický sezónní pohlavní dimorfismus. Který je charakteristický například pro tygříčka tečkovaného (*Amandava amandava*). Sezónní

pohlavní dimorfismus je charakteristický rovněž pro zástupce pravých snovačů – rody (*Euplectus*, *Foudia*, *Kvukelea* a *Sittagra*) (Robiller, 1981, Verhoef–Verhallenová, 1990).

Zvláštní možnosti identifikace pohlaví na základě zbarvení peří představují druhy, u nichž existují barevné mutace s dědičností vázanou na pohlaví. V současné době existuje řada druhů exotických ptáků, u kterých byly takovéto mutace podchyceny a zafixovány. Jako názorný příklad mohu uvést andulku vlnkovanou, korelu chocholatou, rod agapornis, rod alexander, rod rozela a další druhy (Dienstbier 1980, Veger, 1988).

Barva duhovky

Některé druhy ptáků se dají od sebe odlišit podle barvy duhovky. Tento rozdíl je patrný především u papoušků rodu kakadu. Kakadu růžový (*Eolopus roseicapilla*) je charakteristický tím, že samec má barvu duhovky černohnědou, zatímco samička jí má světle hnědou, v některých případech červenou (Vašíček, 2004). Dále je tento rozdíl patrný u kakaduů šalamounských (*Cacatua ducorpsii*), kde samec má oční duhovku šedočernou, zatímco samice jí má hnědou (Kooten, 2010).

Tvar a barva zobáku

U většiny druhů zoborožců se odlišují samci od samic velikostí a tvarem zobáků.

Zoborožec rudozobý (*Tockus erythrorhynchus*) se vyznačuje dlouhým, mírně zahnutým a krvavě rudým zobákem, který je u samce větší než u samičky (Alderton, 2002). Zbarvení zobáku se může u některých druhů měnit během hnízdní sezóny. Alexander čínský (*Psittacula derbiana*). Svrchní část zobáku je u samce sytě červená se žlutou špičkou, zatímco spodní část zobáku je černá (Kooten, 2010). Samička má celý černý zobák (Grahl, 1984).

Někteří autoři uvádí, že je možné vyzorovat rozdíly ve velikosti a tvaru zobáku mezi samci a samicemi u některých velkých papoušků, jako je příklad rod ara. Tyto rozdíly, jsou však mnohdy nejednoznačné a nelze je spolehlivě použít pro určení pohlaví (Verhoef, 2006).

Barva ozobí a přítomnost kožních útvarů na hlavě

Vašíček, (2001) uvádí, že samci u andulek mají ozobí modré, zatímco u samic je toto ozobí bledě modré a v období hnízdění hnědé. V současné době se toto tvrzení může v některých případech odlišovat vlivem barvených mutací. U některých druhů mohou být přítomny některé kožní výrůstky na zobáku. Veger a Kamínek (1980) uvádějí, že u některých

samců hrabavých druhů ptáků jsou přítomny kožní „výrůstky“ na hlavě (poušky a lalůčky), které se v době toku výrazně prokrvují a zvětšují. Tyto kožní deriváty jsou nejvíce zastoupeny u bažantovitých (*Phasianidae*) (Horsfield, 1821) ptáků.

Velikost těla a další tělesné znaky

Veger a Kamínek (1980) uvádějí, že u většiny druhů ptáků, jsou samci větších a mohutnějších postav. To však neplatí pro všechny druhy. Bouchner a Procházka (1997) uvádějí, že u dravců je tomu právě naopak. Samice jsou větší a mohutnější než samci. Rovněž u řady papoušků je pro samce typická větší velikost. V chovatelské praxi je tohoto využíváno pro odhad pohlaví například o rodu rozela, kde mladí samci jsou mnohdy robustnější a větší, s širší hlavou a zobákem. Dalším markerem pro identifikaci pohlaví u rodu *agapornis* může být vzdálenost nohou a vzdálenost pánevních kůstek, které jsou u dospělých chovných samic větší než u samců. U dospělých kanárů lze odlišit pohlaví rovněž na základě tvaru a velikosti kloaky (Verhoef, 2006).

Hlasové projevy

Bouchner a procházka (1997) uvádějí, že u ptáků se nachází zpěvné ústrojí (syrinx). Nejvíce je vyvinuto u pěvců. Samci si v období toku hájí pomocí „zpěvu“ své teritorium a snaží se tak zaujmout samičku. Zpěv samců je používán pro identifikaci pohlaví zejména u některých astrildovitých pěvců, u kterých nejsou patrné ostatní znaky pohlavního dimorfismu. Jedná se zejména o rod (*Lonchura, Poephila, Pada Estrilda*). Naopak u druhů, které jsou považovány za výborné imitátory cizích zvuků, nelze hlasové projevy použít při identifikaci pohlaví. Jedná se zejména o velké papoušky, papoušky ze skupiny loriů a zástupce špačkovitých (rody *Grakula* a *Spreo*).

3.3 Způsoby určování pohlaví u monomorfních druhů ptáků

U většiny druhů ptáků se nedá determinovat pohlaví na základě morfologických vlastností. Harvey et Al. (2006) uvádí, že u dospělých jedinců je to u více jak 60% druhů. A u mláďat je to ještě více (Hyusen et al., 2002).

3.3.1 Endoskopie

Jeden z nejspolehlivějších způsobů, jak určit pohlaví u ptáků je endoskopie. Veterinární lékař daného jedince uspí a pomocí endoskopu (trubička se zvětšujícími čočkami), který zasune do břišní dutiny malým otvorem, určí pohlaví. Pomocí endoskopie

veterinář prohlédne pohlavní orgány. Samičí vaječníky obsahují malé hrbolaté uzlíky, zatímco samčí varlata jsou hladká a jsou fazolovitého tvaru (Abeele, 2006).

Taylor (1992) uvádí, že endoskopii lze provádět z pravé i levé strany a to čtrnácti způsoby.

U většiny ptačích druhů je vyvinutý pouze levý vaječník. Rozvoj pravého vaječníku je obvykle potlačen a to je hlavní důvod, proč se endoskopie provádí především z levé strany. V období hnízdění se pohlavní orgány několikanásobně zvětšují vlivem hormonů (Harrison, 1978).

3.3.2 Určování pohlaví ptáků pomocí DNA markerů

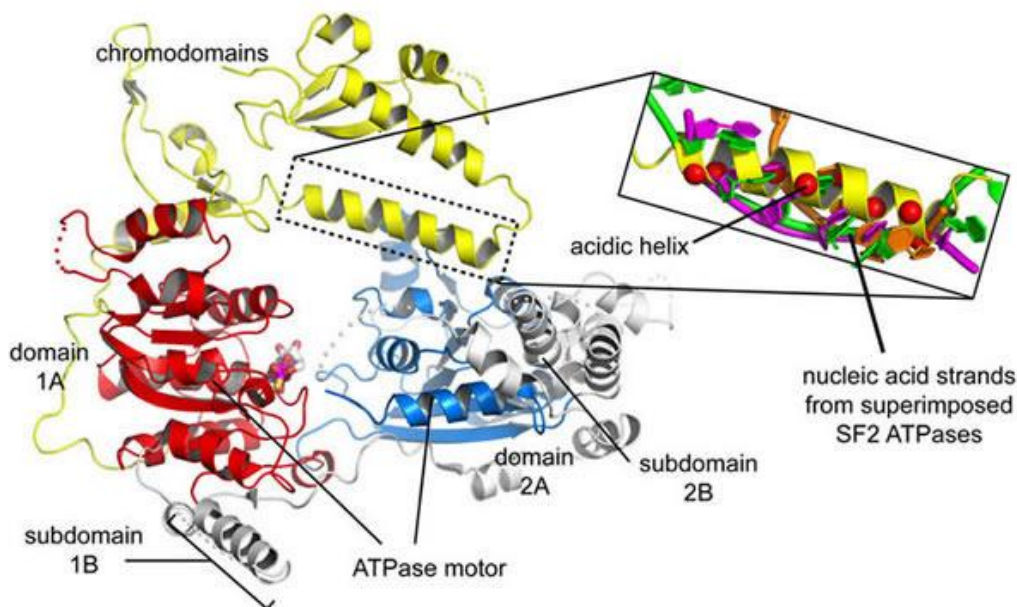
Již v úvodní části literární rešerše byly popsány rozdíly mezi strukturou a velikostí gonozómů Z a W u ptáků. Z této části literární rešerše vyplynulo, že gonozómy Z a W se liší poměrem heterochromatinových a euchromatinových oblastí a celkovou genetickou aktivitou. Genetické experimenty zaměřené na mapování a sekvenování ptačího genomu odhalily, že na gonozómech Z a W jsou lokalizovány geny, u kterých je odlišná velikost intronových oblastí v závislosti na lokalizaci alely na gonozómu Z, nebo gonozómu W. Takovéto geny jsou vhodnými kandidáty pro navržení genetických markerů umožňující identifikaci pohlaví.

Gen CHD1 kódující „Chromohelicase-DNA-Binding Protein 1,“

Typickým příkladem, takového genu je gen CHD1. Jeho alely v závislosti na tom, na kterém gonozómu jsou lokalizovány, jsou některými autory označovány jako CHD1Z a CHD1W. Techniky molekulární genetiky představují vhodný nástroj pro detekci délkového polymorfismu intronu genu CHD1. Gen CHD1 respektive proteinový produkt, který je tímto genem kódován, je považován za velice konzervativní gen po obratlovcích. Sekvence a funkce tohoto genu je studována u řady organismů včetně ptáků. Pro tento gen lze nalézt v literatuře řadu synonym, jako je například ATP dependentní helikáza, nebo chromodoménová helikáza. Exprese genu CHD1 probíhá při vstupu buňky do mitózy a během telofáze je proteinový produkt inkorporován do chromatinu. V chromatinu byla nalezena řada vazebných míst, na které je proteinový produkt CHD1 specificky vázán. Předpokládá se, že protein kódovaný genem CHD1 hraje významnou roli při regulaci transkripce. U proteinového produktu lze identifikovat charakteristické domény, které mají schopnost vázat ATP, DNA a nukleotidy. Molekulární funkce proteinu kódovaného CHD1 spočívají v regulaci tvorby chromatinu, helikázové a hydrolázové aktivity Stokes et al. (1995).

U proteinu kódovaného genem CHD1, je známá jeho prostorová struktura. Na následujícím obrázku 6. jsou znázorněny výše zmíněné domény tohoto proteinu.

Obrázek 6: Doménová struktura proteinu kódovaného genem CHD1 – upraveno podle <http://www.jhu.edu/bowmanlab/images/research-image-project1-notext.jpg>



Strukturu genu CHD1 je možné demonstrovat u ptačího modelového druhu – kura domácí, u kterého byla provedena sekvenace genu. Pro popis struktury tohoto genu jsem použil mezinárodní nukleotidovou databázi Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Na obrázcích 1 a 1 je uvedeno porovnání exonintronové struktury alel genu CHD1, lokalizovaných na gonozómech Z a W u různých živočichů. Z porovnání obrázků vyplývá, že tento gen se vyznačuje napříč různými organismy značně konzervovanou strukturou. U ptáků se problematikou sekvenčních podobností alel genu CHD1 zabývali Griffiths et al. (1996). Na obrázcích 1 a 2 je znázorněna poloha tohoto genu ve fyzické mapě gonozómu Z, respektive gonozómu W u modelového kura domácího. Na obrázcích 1 a 2 je znázorněno detailní rozlišení exonů a intronů u genů CHD1 lokalizovaného na gonozómu Z, nebo W rovněž u kura domácího. Z těchto dvou posledních obrázků vyplývá, že alela genu CHD1 lokalizovaná na gonozómu Z je tvořena 38 exony. Alela lokalizovaná na gonozómu W je tvořena 40 gonozómy.

Markery délkově polymorfních intronů genu CHD1 vhodné pro identifikaci pohlaví u ptáků

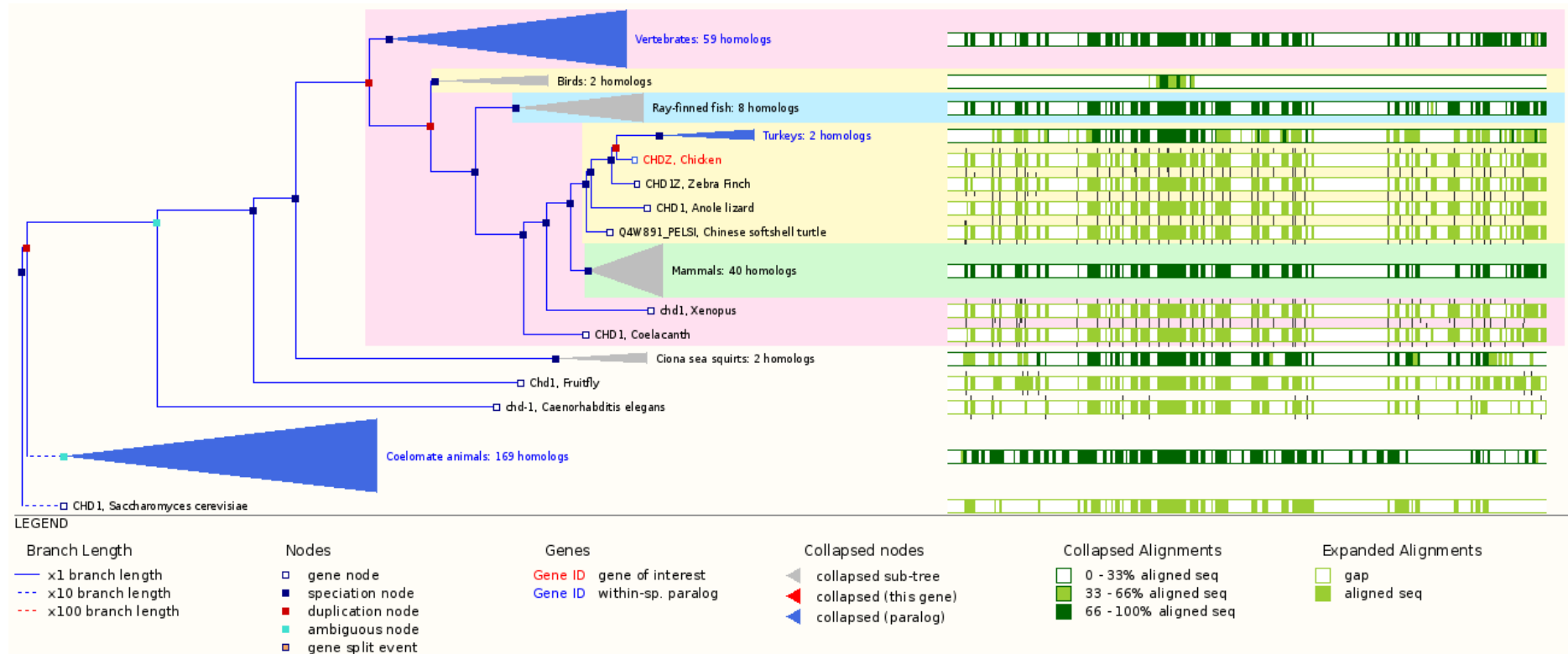
An et al (2007) uvádí, že aplikace markerů genu CHD1 je vhodné nejen pro identifikaci pohlaví ptáků, ale rovněž i pro další forenzní analýzy. Costantini et al. (2008) a Fukui et al (2008) předpokládají, že markery délkově polymorfních intronů genu CHD1 je možné použít rovněž v ekologických a evolučních studiích, při konzervaci a popisu genetických zdrojů nebo ve šlechtitelských programech.

Délkově polymorfní PCR marker, kdy F primer je situován do pozice 23. exonu a R primer se nachází v 24. exonu, navrhli Griffiths e al (1998). Tato sekvence primerů je ve vědecké literatuře bběžně označována jako primerový pár P2 – P8. Tato kombinace primerů byla použita i při řešení experimentální části bakalářské práce. V přehledné tabulce 1 je uveden soubor druhů ptáků a autorů, kteří tento marker použili.

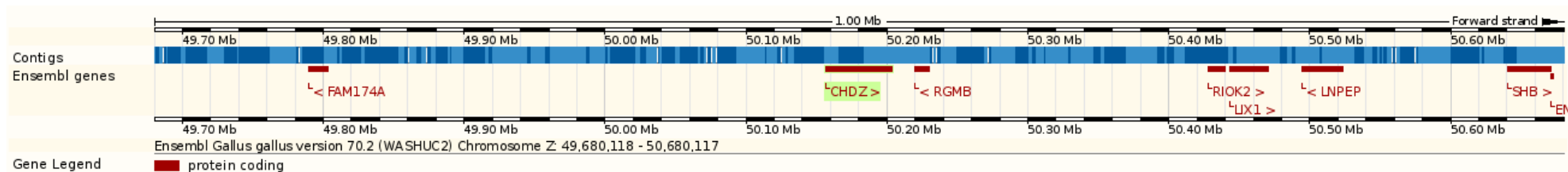
Oblibnou strategii pro navržení PCR markerů použili Fridolfsson a Ellegren (1999), kteří rovněž navrhli dvojici primerů lokalizovaných do exonů 17 a 18. Tato dvojice primerů je v literatuře označována jako 2550F – 2718R. Použití těchto markerů u různých ptačích druhů je přehledně zpracováno v tabulce 1. Rovněž dvojice primerů 2550F – 2718R byla použita při řešení bakalářské práce.

V tabulce 1 jsou symboly + a – vyznačeny situace, kdy pomocí jednotlivých markerů byly charakterizovány gonozómy Z a W.

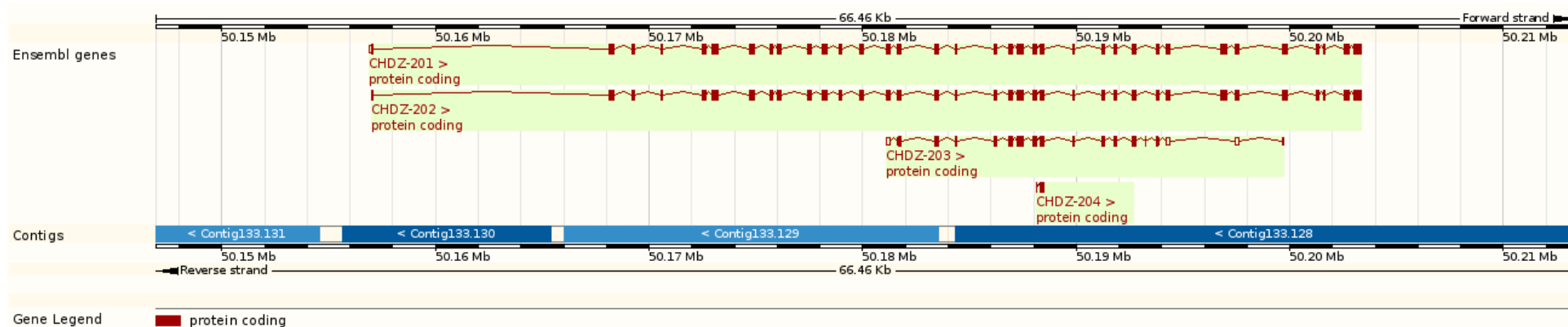
Obrázek 7: Sekvenční podobnosti mezi alelami genu CHD1 lokalizovanými na gonozómu Z u různých obratlovců – upraveno podle Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)



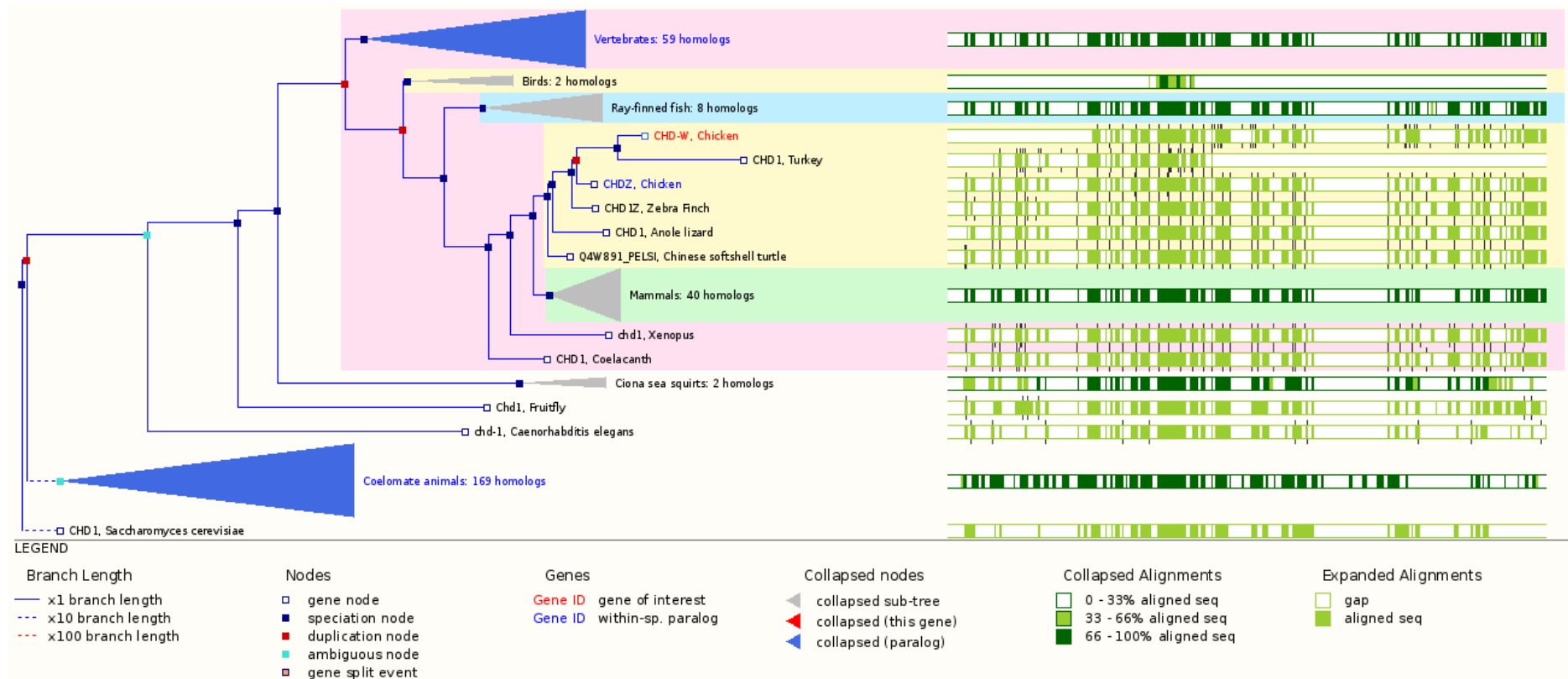
Obrázek 8: Poloha genu CHD na gonozómu Z u kura domácího – upraveno podle Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)



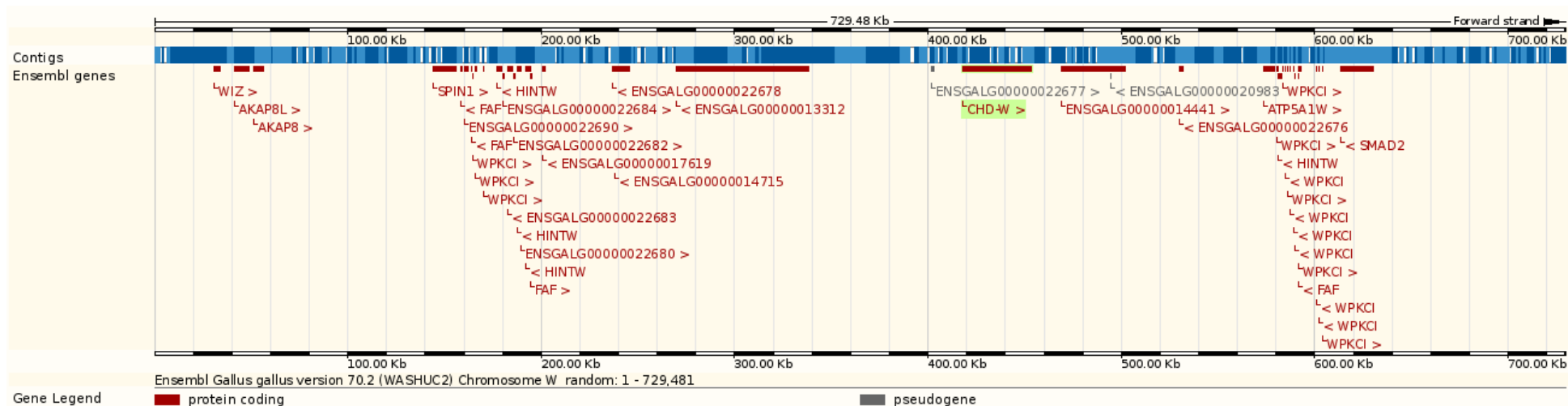
Obrázek 9: Exonové a intronové části genu CHD na gonozómu Z u kura domácího – upraveno podle Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)



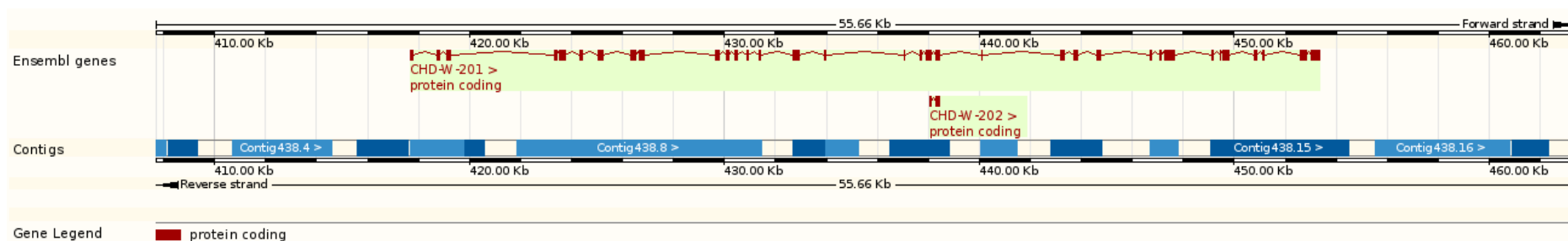
Obrázek 10: Sekvenční podobnosti mezi alelami genu CHD1 lokalizovanými na gonozómu W u různých obratlovců – upraveno podle Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)



Obrázek 11: Poloha genu CHD na gonozómu W u kura domácího – upraveno podle Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)



Obrázek 12: Exonové a intronové části genu CHD na gonozómu W u kura domácího – upraveno podle Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)



Tabulka 1: Přehled druhů ptáků, u kterých byly aplikovány molekulární markery pro identifikaci pohlaví – 1. část

Druh		Marker – pár primerů				Autoři
		P2 + P8		2550 + 2718		
český název	latinský název	Z	W	Z	W	
agapornis fischeri	<i>Agapornis fischeri</i>			+	+	Khan et al. (1998)
amazoňan modročelý	<i>Amazona aktiva</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
amazoňan oranžovokřídlý	<i>Amazona amazonica</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
amazoňan žlutohlavý	<i>Amazona matrix</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
amazonek černotemenný	<i>Pionites melanocephalus</i>	+	+	+	+	Cortes et al (1999)
ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>			+		Khan et al. (1998)
ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
ara malý	<i>Ara severa</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
ara zelenokřídlý	<i>Ara chloroptera</i>			+		Khan et al. (1998)
ara zelenokřídlý	<i>Ara chloroptera</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
ara zelenokřídlý	<i>Ara chloropterus</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
aratinga červenolící	<i>Aratinga erythrogenys</i>	+	+	+	+	Kahn et al (1998)
aratinga dlouhoocasý	<i>Aratinga acuticaudata</i>	+	+	+	+	Kahn et al (1998)
aratinga dlouhoocasý	<i>Aratinga acuticaudata</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
aratinga jenday	<i>Aratinga jendaya</i>	+	+	+	+	Kahn et al (1998)
aratinga slunečnní	<i>Aratinga solstitialis</i>	+	-	+	-	Kahn et al (1998)
argus okatý	<i>Argusianus argus</i>			+	+	Khan et al. (1998)
bažant červenolící	<i>Lophura erythrophthalma</i>			+	+	Khan et al. (1998)
bažant malajský	<i>Polyplectron malacense</i>			+	+	Khan et al. (1998)

Tabulka 1: Přehled druhů ptáků, u kterých byly aplikovány molekulární markery pro identifikaci pohlaví – 2. část

Druh		Marker – pár primerů				Autoři
		P2 + P8		2550 + 2718		
český název	latinský název	Z	W	Z	W	
bažant obecný	<i>Phasianus colchicus</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
berneška bělolící	<i>Branta leucopsis</i>			+	+	Khan et al. (1998)
berneška bělolící	<i>Branta leucopsis</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
berneška havajská	<i>Branta leucopsis</i>	+	+	+	+	Cortes et al (1999)
berneška velká	<i>Branta canadensis</i>			+		Khan et al. (1998)
berneška velká	<i>Branta canadensis</i>	+	+	+	+	Cortes et al (1999)
čáp bílý	<i>Ciconia ciconia</i>	+	-	+	-	Cortes et al (1999)
čáp pestrý	<i>Ciconia stormi</i>			+		Khan et al. (1998)
čírka modrokřídlá	<i>Anas discors</i>			+		Peters et al. (2005)
emu hnědý	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	+	+	+	+	Kahn et al (1998)
hohol severní	<i>Bucephala clangula</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
holub chocholátý	<i>Ocyphaps lophotes</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
holub nikobarský	<i>Caloenas nicobarica</i>			+	+	Khan et al. (1998)
holub olivový	<i>Columba arquatrix</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
holub skalní	<i>Columba livia</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
husa indická	<i>Anser indicus</i>	+	+	+	+	Cortes et al (1999)
husice egyptská	<i>Alopochen aegyptiacus</i>	+	+	+	+	Cortes et al (1999)
husička vdovka	<i>Dendrocygna viduata</i>			+	+	Suh et al. (2011)
hvízdák americký	<i>Anas americana</i>			+		Peters et al. (2005)

Tabulka 1: Přehled druhů ptáků, u kterých byly aplikovány molekulární markery pro identifikaci pohlaví – 3. část

Druh		Marker – pár primerů				Autoři
		P2 + P8		2550 + 2718		
český název	latinský název	Z	W	Z	W	
hvízdák chilský	<i>Anas sibilatrix</i>			+		Peters et al. (2005)
ibis rudý	<i>Eudocimus ruber</i>	+	-	+	-	Cortes et al. (1999)
jeřáb královský	<i>Balearica regulorum</i>			+	+	Khan et al. (1998)
jeřáb královský	<i>Balearica regulorum</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
jeřáb královský	<i>Balearica regulorum</i>			+	+	Khan et al. (1998)
kachnička karolínská	<i>Aix sponsa</i>			+		Peters et al. (2005)
kajka mořská	<i>Somateri mollissima</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
kakadu bílý	<i>Cacatua alba</i>	+	+	+	+	Kahn et al. (1998)
kakadu molucký	<i>Cacatua moluccensis</i>			+	+	Khan et al. (1998)
kakadu molucký	<i>Cacatua moluccensis</i>	+	+	+	+	Kahn et al. (1998)
kakadu žlutočečelý	<i>Cacatua galerita</i>			+	+	Khan et al. (1998)
kakadu žlutočečelý	<i>Cacatua galerita</i>	+	+	+	+	Kahn et al. (1998)
kakadu žlutolící	<i>Cacatua sulphurea</i>	+	+	+	+	Kahn et al. (1998)
kakariki chathamský	<i>Cyanoramphus forbesi</i>			+	+	Tokunaga et al. (2007)
kakariki rudočelý	<i>Cyanoramphus novaezelandiae chathamensis</i>			+	+	Tokunaga et al. (2007)
kasuár přílbový	<i>Casuarius casuarius</i>	+	+	+	+	Kahn et al. (1998)
kolpík růžový	<i>Platalea Taja</i>	+	-	+	-	Cortes et al. (1999)
korela chocholatá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	+	+	-	-	Turk et al. (2007)
korunáč vějířový	<i>Goura victoria</i>			+	+	Khan et al. (1998)

Tabulka 1: Přehled druhů ptáků, u kterých byly aplikovány molekulární markery pro identifikaci pohlaví – 4. část

Druh		Marker – pár primerů				Autoři
		P2 + P8		2550 + 2718		
český název	latinský název	Z	W	Z	W	
krkavec velký	<i>Corvus corax</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
krocán divoký	<i>Meleagris gallopavo</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
křepelka japonská	<i>Coturnix Japonka</i>			+		Brubaker et al. (2011)
kur domácí	<i>Gallus gallus f. domestica</i>			+	+	Khan et al. (1998)
kur domácí	<i>Gallus gallus f. domestica</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
labuť černá	<i>Cygnus stratus</i>			+	+	Khan et al. (1998)
labuť trubač	<i>Cygnus buccinator</i>			+	+	Bartosch et al. (2003)
labuť velká	<i>Cygnus olor</i>			+	+	Khan et al. (1998)
luňák brahmínský	<i>Haliastur indus</i>			+		Khan et al. (1998)
luňák hnědý	<i>Milvus migrant</i>			+	+	Khan et al. (1998)
lžičák pestrý	<i>Anas clypeata</i>			+		Peters et al. (2005)
nandu pampový	<i>Rhea americana</i>	+	+	+	+	Kahn et al. (1998)
nesyt bílý	<i>Mycteria cinerea</i>			+	+	Khan et al. (1998)
orebice rudá	<i>Alectoris rufa</i>			+	+	Berlin et al. (2006)
orel bělobřichý	<i>Haliaeetus leucogaster</i>			+	+	Khan et al. (1998)
ostralka štíhlá	<i>Anas acuta</i>			+		Peters et al. (2005)
papoušek červenokřídlý	<i>Aprosmictus erythropterus</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
papoušek patagonský	<i>Cyanoliseus patagonus</i>	+	+	+	+	Kahn et al. (1998)
páv zelený	<i>Pavo muticus</i>			+	+	Khan et al. (1998)

Tabulka 1: Přehled druhů ptáků, u kterých byly aplikovány molekulární markery pro identifikaci pohlaví – 5. část

Druh		Marker – pár primerů				Autoři
		P2 + P8		2550 + 2718		
český název	latinský název	Z	W	Z	W	
pelikán africký	<i>Pelecanus rufescens</i>			+	+	Khan et al. (1998)
perlička lesní	<i>Guttera plumifera</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
perlička supí	<i>Acryllium vulturinum</i>	+	+	+	+	Garcia a Mindell (2003)
potápka roháč	<i>Podiceps cristatus</i>	+	+	+	+	Kahn et al. (1998)
pštros dvouprstý	<i>Struthio camelus</i>			+	+	Khan et al. (1998)
puštík tečkovaný	<i>Strix seloputo</i>			+	+	Khan et al. (1998)
pyrura hnědouchý	<i>Pyrrhura frontale</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
racek stříbřitý	<i>Larus argentatus</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
racek šedý	<i>Larus hyperboreus</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
slípka modrá	<i>Porphyrio porphyrio</i>			+	+	Khan et al. (1998)
sojka zlověstná	<i>Perisoreus infaustus</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
sova pálená	<i>Tyto alba</i>			+	+	Khan et al. (1998)
sup královský	<i>Torgos tracheliotus</i>			+		Khan et al. (1998)
tetřívěk obecný	<i>Tetrao tetrix</i>			+	+	Montell et al. (2001)
tetřívěk pelyňkový	<i>Centrocercus urophasianus</i>			+	+	Sundstrom et al. (2003)
tricha orlí	<i>Psittrichas fulgidus</i>			+		Khan et al. (1998)
vrána černá	<i>Corvus corone corone</i>			+	+	Fukui et al. (2008)
vrána vrubozobá	<i>Corvus macrorhynchos japonensis</i>			+	+	Fukui et al. (2008)
výr velký	<i>Bubo bubo</i>	+	+	+	+	Cortes et al. (1999)
žako šedý	<i>Psittacus erithacus</i>			+	+	Khan et al. (1998)
žako šedý	<i>Psittacus erithacus</i>	+	+	+	+	Cortes et al (1999)

3.4 Typy genetických markerů

Experimentální část bakalářské práce je zaměřena na aplikaci PCR markerů pro identifikaci pohlaví ptáků. Z těchto důvodů jsem do následující kapitoly zpracoval stručný přehled a charakteristiku molekulárních markerů, které mají vztah ke konkrétním experimentům bakalářské práce.

3.4.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR objevil americký biochemik Kary Mullis, který za tento objev získal Nobelovu cenu v roce 1993 (Griffin a Griffin, 1994). Základní jednotkou PCR je jeden cyklus, který se skládá ze tří částí. Schéma metod PCR je uvedeno na obrázku 13.

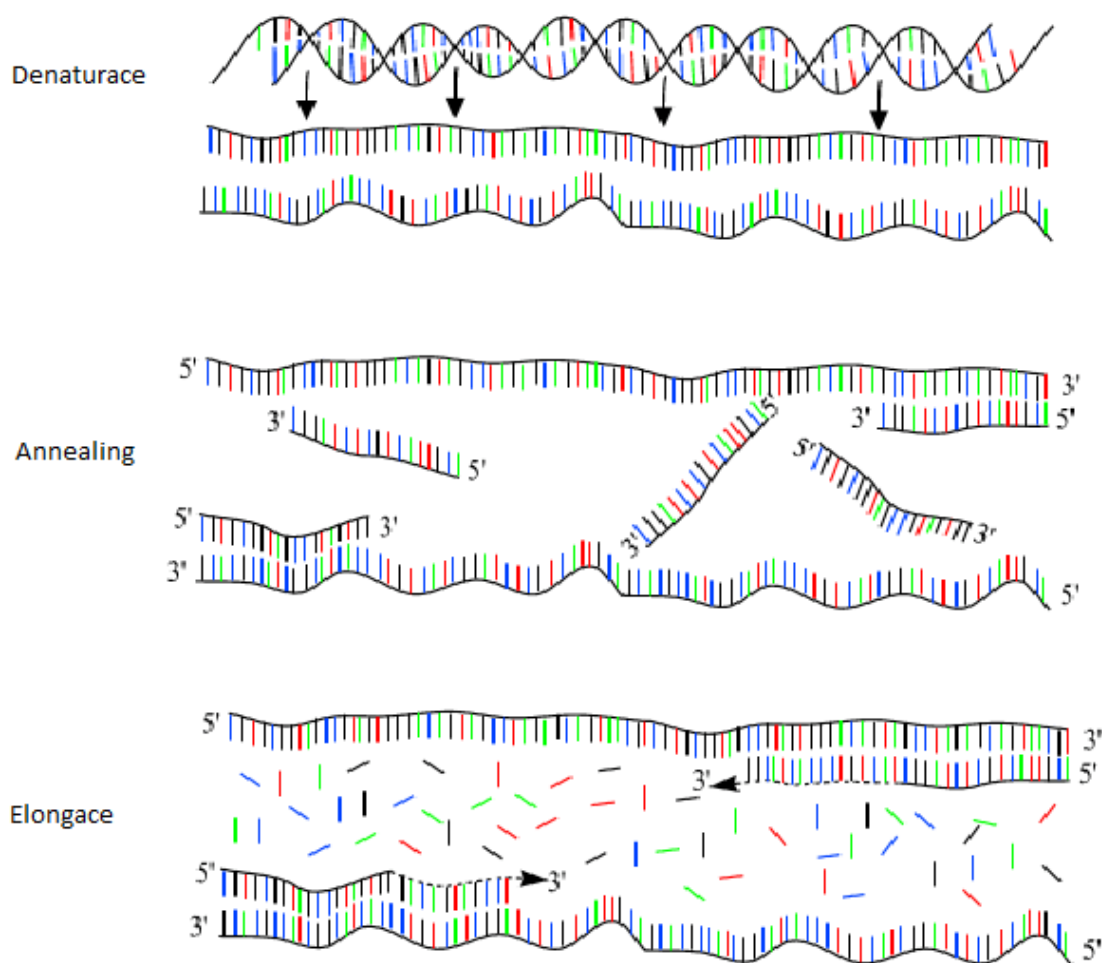
Prvním krokem je denaturace templátové DNA, potom dochází k nasedání primerů tzv. „annealing“ a následné prodlužování nově vzniklého řetězce „elongace“. Tento cyklus se opakuje 25 až 35 krát (Snustad a Simmons, 2009).

V prvním kroku je genomová DNA obsahující sekvence, které mají být amplifikovány, denaturována zahřátím při teplotě 92 - 95 °C po dobu asi 30 sekund.

Druhým krokem je denaturovaná DNA hybridizována s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů tak, že se společně inkubují při 50 - 60 °C po dobu asi 30 sekund. Optimální teplota pro připojení primerů je závislá na tom, z kolika a jakých bází jsou složeny.

U třetího kroku je použita DNA-polymeráza pro replikaci úseku DNA mezi místy komplementárními k oligonukleotidovým primerům. Primer poskytuje volnou 3'-OH skupinu, která je potřebná pro kovalentní navázání dalšího nukleotidu a následné prodlužování řetězce. Denaturovaná genomová DNA přitom zajišťuje funkci templátu. K polymeraci většinou dochází při 70 - 72°C po dobu 1,5 minuty. V následujícím cyklu se produkty prvotního cyklu replikace denaturují a po připojení primerů se replikují DNA-polymerázou (Snustad a Simmons, 2009). Díky polymerázové řetězové reakci lze provádět amplifikaci fragmentů genů a dalších sekvencí DNA in vitro (Snustad a Simmons, 2009).

Obrázek číslo 13: Schéma metody PCR - upraveno podle Vierstraete (2001).



3.4.2 Gelová elektroforéza

Velikost restrikčních fragmentů lze rozeznat polyakrylamidovou nebo agarózovou gelovou elektroforézou. Pomocí struktury DNA, která je dána nukleotidovými podjednotkami s jednou fosfátovou skupinou na každý jednotlivý nukleotid, má DNA konstantní náboj na jednotku hmotnosti. Pomocí rychlosti migrace fragmentů DNA během elektroforézy tak můžeme určit přibližnou jejich délku, přičemž tato rychlost je nepřímo úměrná délce fragmentů (Snustad a Simmons, 2009).

Nejdříve se nanesou fragmenty DNA do žlábků agarózového gelu, ve kterém je mikroskopická síť pórů a poté je gel umístěn do elektrického pole (Alberts et al., 1998).

Dlouhé úseky se v gelu pohybují pomaleji, z důvodu zpomalení v hustém gelu. Fragmenty se v gelu po nějaké době rozdělí podle velikosti, za vzniku „žebříku“ z jednotlivých proužků tvořených molekulami DNA o stejné velikosti. Pro viditelnost DNA

v agarózovém či polyakrylamidovém gelu je nutné ji nějakým způsobem obarvit. Jednou z možností je přimíchání DNA s látkou, která po navázání na DNA fluoreskuje pod ultrafialovým zářením. Nejčastěji používanou látkou je ethidium bromid (Alberts et al., 1998).

3.4.3 Kapilární elektroforéza

V současné době jsou vyvíjeny technologie, díky kterým je možno pozorovat změny v hladinách velkých souborů GFP - fúzních proteinů pomocí kapilární elektroforézy (elektroforézy probíhající v malých kapilárních trubičkách) monitorováním díky citlivých mikrofotodetektorů a důmyslného softwaru (Snustad a Simmons, 2009).

Separace probíhá v kapiláře, která je naplněné roztoky polymerů. Tyto roztoky působí jako molekulární síto, kde se jednotlivé analyzované částice rozdělí podle svých různých elektroforetických pohyblivostí. Slouží například pro oddělení biologických makromolekul, jako jsou fragmenty DNA a bílkoviny, na základě jejich molekulové hmotnosti. Další možností uplatnění této metody je pro stanovení sacharidů vitamínů a barviv (Lemos et al., 2001; Tone, 1982, Ugaz a Christensen, 2007).

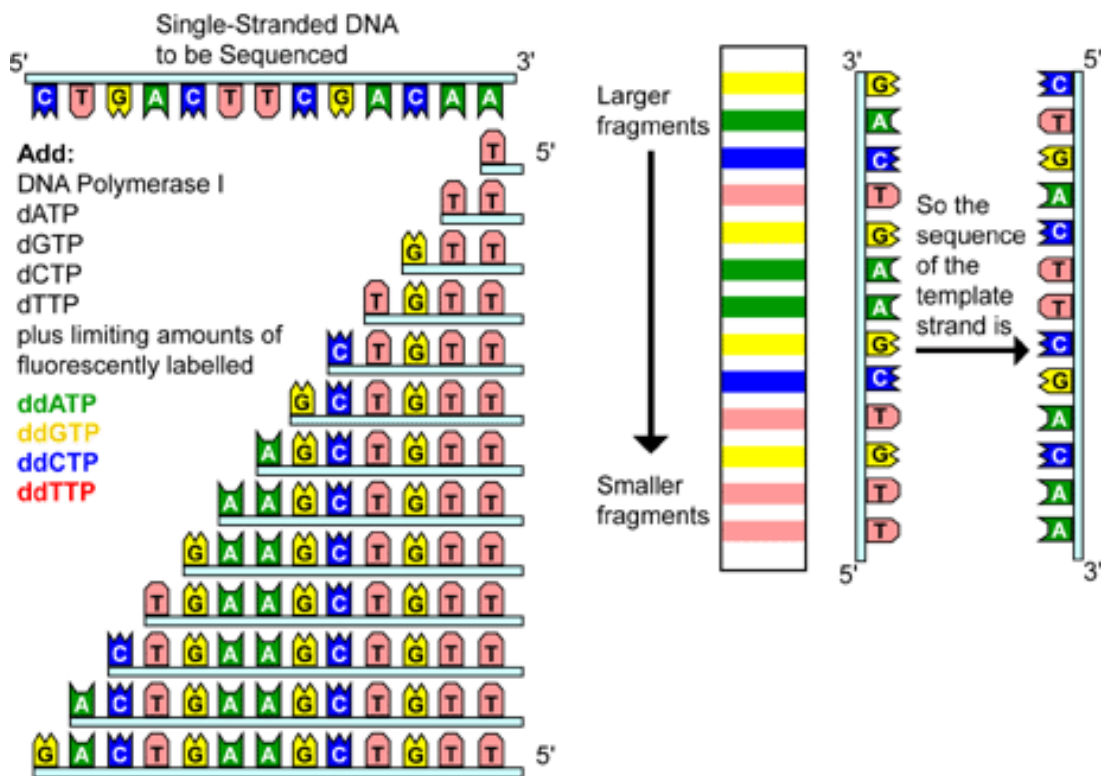
U vzorků, které jsou fluorescenčně označené, dojde po nasvícení laserem k excitaci fluoroforů a vzniklý signál je zaznamenáván pomocí fotodetektoru (Ugaz a Christensen, 2007, Sambrook 1989). Z elektroforegramu vzniká kvalitativní informace, která je časem dána jeho „peaku“. Obě tyto informace jsou matematicky porovnány softwarem vzhledem ke hmotnostnímu standardu (Kašička, 1997).

3.4.4 Sekvenování

V současné době je možné sekvenovat téměř jakoukoliv molekulu DNA a to díky několika hlavním objevům. Pomocí gelové elektroforézy je možné rozdělit fragmenty DNA, které se liší o délku jednoho nukleotidu (Snustad a Simmons, 2009). Sekvence DNA jsou prováděny v sekvenčních přístrojích. Hlavní rozdíl mezi metodou sekvence na gelech, které jsou umístěny mezi skleněnými deskami a automatickým sekvenováním DNA, spočívá v použití fluorescenčních barviv, místo radioaktivních izotopů pro detekci řetězců DNA. Dále se od sebe odlišují elektrickou separací produktů všech dideoxyterminátorových reakcí společně v jedné dráze gelu, nebo kapiláře. Rozdíl je i v použití fotobuňky k detekci fluorescence barviv při jejich průchodu gelem nebo kapilárou a poslední odlišností je přímý přenos fotobuňky do počítače, který vzorky automaticky analyzuje a zaznamenává výsledky

(Snustad a Simmons, 2009). Princip Sangerovy metody sekvenace je znázorněn na obrázku 14.

Obrázek 14: Princip Sangerovy metody sekvenace DNA – upraveno podle http://www.daividdarling.info/encyclopedia/D/DNA_sequencing.html



3.5 Modelové druhy ptáků

Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na charakterizaci markerů alel genu CHD1 u konkrétních druhů ptáků. V této závěrečné kapitole literárního přehledu bych rád uvedl stručnou zoologickou charakteristiku použitých modelových druhů, včetně znaků pohlavního dimorfismu. Fotodokumentace hodnocených druhů ptáků je součástí přílohy bakalářské práce.

Labuť velká

***Cygnus olor* (J. F. Gmelin, 1789)**

Mezi všemi labutěmi poznáme labuť velkou podle tvaru krku, který připomíná písmeno S. Hlavy se zobákem směřujícím dolů a podle křídel mírně zdvižených nad tělo. Veškeré peří dospělých labutí je sněhově bílé. Horní čelist zobáku je tmavě oranžová až červená. Na kořeni zobáku se nachází kožní hrbol, který je neopeřený. Uzdečky, okraje horní čelisti, nehet na jejím konci, okraje nosních dírek a spodní čelist jsou černé. Nohy jsou šedočerné. Dospělý pták dosahuje délky až 152 cm. Samice jsou menší, na kořeni zobáku má menší hrbol a zobák je světle oranžový. Mláďata mají zobák barvy světle růžové, bez černého hrbolu, a peří je hnědošedé (Veger, 1980).

Kachna divoká

***Anas platyrhynchos* (Linnaeus, 1758)**

Vyskytuje se na velkém areálu zahrnujícím téměř celou Euroasii (Veger, 1980). Na všech typech vod: na přehradních nádržích, rybnících, jezerech, na řekách i potocích a to až do výše 1000 m n. m., na nádržích a jezírkách v parcích uprostřed rušných měst (Bouchner, Procházka 1997). Samec má horní část krku a hlavu kovově zelenou, bílý pásek na krku odděluje tuto barvu od hnědého volete a hrudi. Záda jsou šedohnědá, ocasní pera tmavě hnědá, křídla šedohnědá s modrozeleným zrcátkem, lemovaným po obou stranách bílými pásky. Spodní část těla je světle šedá. Samice je převážně hnědá s černým lemováním, na křídlech má modrozelené zrcátko, které je z obou stran ohraničeno bílými proužky. Samice má zobák žlutý, zatímco samec ho má zelený (Veger, 1980).

Kachna domácí

Anas platyrhynchos f. domestica

V okolí zobáku a očí má kačer podstatně větší neopeřenou červenou bradavičnatou kůži, na které vyrůstá kulovitý masitý výrůstek (Veger, 1980). Kachna je menší a holou červenou kůži má pouze před očima směrem k zobáku, masitý výrůstek nad zobákem není vyvinut (Veger, 1980). Hmotnost kačera je kolem 3 – 3,5kg, hmotnost kachny je menší a váží kolem 2 - 2.5kg (Špaček, 1987).

Husa domácí

Anser anser f. domesticus

Předkem husy domácí je husa velká, samec se od samice odlišuje mohutnější tělesnou stavbou. Samice váží 2 – 3,5 kg, zatímco samec 4 – 5 kg. (Špaček, 1987).

Křepelka čínská

***Coturnix chinensis* (Linnaeus, 1766)**

Sameček se vyznačuje modrošedým zbarvením čela, strany hlavy, volete a bočních partií těla. Brada a hrdlo až k ušním otvorům jsou bílé, černě lemované s černým úzkým páskem uprostřed. Svrchní část těla je hnědavá příčně pruhovaná. Střední křídelní krovky jsou tmavě červenohnědé lemování. Ocas a spodní části těla jsou kaštanově hnědé, zobák černý, oči tmavočervené a nohy jsou oranžově žluté. Samička je naopak nenápadně zbarvena, téměř celá hnědá, vespod je světlejší a peří, kromě na tvářích a hrdle, má tmavě žíhané. Délka dospělých křepelk je 12 cm (Veger, 1991).

Kur domácí

Gallus gallus f. domesticus

Petříčková (2002) a uvádí, že *Gallus gallus f. domestica* byl a stále je nedílnou součástí sortimentu z domácích zvířat ve většině lidských kultur. Kohouti váží 2,3-2,5 kg, slepice 2,0-2,3 kg (Špaček, 1987).

Krocan domácí

Meleagris gallopavo

Krocan domácí byl vyšlechtěn z krocana divokého. Pohlavní dimorfismus je výrazný. Samec i samice mají na hlavě a krku holou červenou kůži. Samec se od samice odlišuje výrůstkem na čele, který mu visí směrem k zemi (Veger, 1980). Dospělý krocan váží 7,5 - 10kg, krůta je o něco drobnější a váží 4,5 - 6,5kg (Špaček, 1987).

Racek šedokřídlý

***Larus glaucescens* (Neumann, 1840)**

Je monogamně hnízdící druh ptáka, žijící v kolonii. Pohlavní dimorfismus je velmi slabě vyvinut a na základě vnějších morfologických znaků nelze pohlaví odlišit. Samec je větší a má o něco delší zobák než samice (Cramp, 1983).

Holub domácí

Columba domestica

Při zjišťování pohlaví vycházíme především ze zevních znaků a z chování jedince. Holubi bývají zpravidla většího tělesného rámce, mají poněkud větší hlavu, širší čelo a silnější zobák. Vyznačují se zpravidla živější a agresivnější povahou. Vrkají výrazněji než holubice. Holubice bývají v těle poněkud drobnější než holubi, mívají menší hlavu a užší čelo. Jsou menšího tělesného rámce klidnější povahy. Při dvoření holuba lehce potřásají letkami. Dalším rozlišovacím znakem je vzdálenost pánevních kůstek, kde u samců jsou tyto kůstky téměř u sebe, zatímco u samic je tato vzdálenost větší. Pohlaví holubů nelze vždy stanovit s naprostou určitostí. (Bureš, Zavadil, 1972).

Holub hřivnáč

***Columba palumbus* (Linnaeus, 1758)**

Holubovití jsou ptáci žijící v monogamním svazku a hnízdí zpravidla na stromech, v dutinách stromů nebo skalních štěrbinách. Holub hřivnáč je největší evropský zástupce této čeledi. Hnízdo si staví z drobných větviček v korunách stromů, které spíš připomíná napadané chrástí. Většinou je tak řídké, že vejce dnem hnízda prosvítají. O mláďata se starají oba rodiče ojedinelým způsobem. Jejich vole, v němž se změkčují semena rostlin před polknutím do žaludku, produkují v době hnízdění zvláštní kašovitou stravu. Vole je prostorné a skládá se ze dvou postranních vaků. V době krmení mláďat jim vnitřní strana volete zduří a naplňuje se tukem, který se postupně odlupuje. Tak vzniká „holubí mléko“ (Bouchner, 1997).

Hrdlička zahradní

***Streptopelia decaocto* (Frisvaldszky, 1838)**

Bouchner a Procházka (1997) uvádějí, že původním areálem hrdličky zahradní je Balkánský poloostrov. Je šedookrově zbarvená s polovičním kroužkem kolem krku a širokým bílým lemem na konci ocasu. Veger a Šálek (1991), uvádějí, že samice je stejně zbarvená jako samec.

Andulka vlnkovaná

***Melopsittacus undulatus* (Shaw, 1805)**

Andulky obývají ve velkém počtu suché vnitrozemí téměř celého Australského kontinentu (Alderton, 2002).

Andulky vlnkované mají zadní část těmě, strany krku, horní záda a křídla světle zelené barvy s černými a žlutými pruhy na hlavě, krku a uššími a řidšími na křídlech, kde jsou péra bíle lemovaná. Záda, kostřec, vrchní krovky ocasní a spodní části těla jsou jasně zelené, čelo, uzdička, hrdlo a přední partie lící jsou žluté, s modrými skvrnami. Přes hrdlo řada černých skvrn, po stranách hrudi jsou zelenavě žlutá, s úzkými černými pruhy. Spodní krovky křidelní jsou zelené, krovky ruční bledě modré, letky ruční a loketní zelené, zakončené žlutě, střední ocasní péra jsou tmavě modrá a ostatní péra jsou zelenomodrá se širokou žlutou skvrnou uprostřed, zobák u těchto papoušků je olivově šedý, ozobí modré, duhovka bílá a nohy jsou šedavě modré. Andulky jsou pohlavně dospělé kolem šestého měsíce věku, kdy se jim začíná vybarvovat ozobí, které je u andulek modré u samečků a hnědé u samic (Vašíček, 2001).

Agapornis růžohrdlý

***Agapornis roseicollis* (Vieillot, 1818)**

Agapornis růžohrdlý je vnímán jako přechodná forma mezi dimorfní skupinou agapornisů a skupinou s bílým okružím.

Agapornis růžohrdlý je převážně zelený a asi šestnáct centimetrů dlouhý papoušek. Masky je u přírodních ptáků na čele tmavě růžová až červená a postupně směrem k hrdlu bledne. Kostřec je modrý. Ocas je modrý s červenými skvrnami. Zobák je rohovitě barvy, nohy i dráčky jsou šedočerné (Abeele, 2006).

V období hnízdění lze zjistit pohlaví ptáků vyšetřením pánevních kostí – u samic je vzdálenost mezi těmito kůstkami těsně nad břichem větší, je to z důvodů průchodnosti vajíček vejcovodem. Dalším determinacním znakem pohlaví je chování ptáků v této době – samička tráví hodně času stavbou hnízda, zatímco sameček se stavby neúčastní (Alderton, 2002).

Ara ararauna

***Ara ararauna* (Linnaeus, 1758)**

Ara ararauna žije převážně v pralesích Jižní Ameriky na rozlehlém území kolem vodních toků. Prozradí je jejich pronikavý křik. Hnízdí v dutinách objemných stromů, které si upravují svým velkým zobákem (Vašíček 2001).

Celkové zbarvení je modré, boční strany krku, vrchní část hrudi, břicho, spodní krovky křídelní a ocasní jsou žluté. Čelo je zelené. Holé uzdičky a oblast tváří jsou bílé s vícero černými proužky peří. Svrchní strana ocasu je modrá a spodní strana je olivově žlutá. Zobák je celý černý, duhovka je světle žlutá a nohy jsou tmavošedé. Arové jsou monomorfní ptáci. Samec bývá o něco mohutnější a obvykle má také širší zobák a o něco větší a placatější hlavu (Kooten, 2010).

Papoušek mniší

***Myopsitta monachus* (Boddaert, 1783)**

Mníšci šedí jak jsou některými chovateli nazýváni, patří mezi papoušky žijící ve velkých koloniích. Zvláštěností u mnišků je stavba hnízda, která si staví z větví v korunách stromů, což pro papouškovité druhy není běžné. Na jednom stromě může hnízdit i několik párů. Na stavbě hnízda se podílí především samec, zatímco samička se účastní jen drobných úprav uvnitř hnízda. Mezi samcem a samicí nejsou žádné dimorfní rozdíly (Kooten, 2010).

Kakadu růžový

***Eolopus roseicapilla* (Vieillot, 1817)**

Kakadu růžový obývá převážně nížiny i náhorní plošiny celého kontinentu Austrálie, v posledních letech však proniká i do pobřežních oblastí, kde způsobuje škody na zemědělských plodinách (Vašíček, 2004). Mimo období hnízdění se shromažďují v hejnech čítajících až tisíc jedinců. Mezi oběma pohlavími je rozdíl ve zbarvení oční duhovky. U dospělých ptáků mají samci hnědou duhovku, zatímco u samic je červenohnědá (Kooten, 2010).

Žako šedý

***Psittacus erithacus* (Linnaeus, 1758)**

Celkové zbarvení je šedé. Kolem očí mají neopeřené bělavé okruží. Kostřec je šedobílý. Na vrchní a spodní straně ocasu mají peří červené, což je pro tento druh charakteristické. Oči jsou světle až zářivě žluté, zobák je černý a nohy jsou tmavošedé. Většinou jsou samci spíše tmavší a hlavu mají spíše kulatější než samice. Také zobák bývá u samic menší a okruží směřuje do špičky než u samců (Kooten, 2010). Papoušek šedý obývá Afriku, Pobřeží slonoviny až ke Kongu, ostrovy Fernando Poó a Principe (Grahl, 1984).

Havran polní

***Corvus frugilegus* (Linnaeus, 1758)**

Na rozdíl od vran obecných, které jsou typicky samotářské a jednotlivá hnízda budují daleko od sebe, jsou havrani polní společenšší a podobně jako volavky hnízdí v početných koloniích. Zdržují se v zemědělsky využívané krajině téměř celé Evropy. U havranů je možné podle opeření zobáků rozeznat mladé ptáky od starých. Mladí jedinci mají kořeny zobáků opeřené a od druhého roku stárí jim zde peří vypadá a na hrdle i nad kořenem horní čelisti zůstane holá, šedobílá a šupinatá kůže (Bouchner, 1997). Na hnízdiště přilétají páry koncem února až začátkem března, kdy začnou opravou hnízd, popřípadě, stavějí hnízda nová. U hnízda dochází také k toku, při němž samec roztahuje vějířovitě ocasní péra, načepýří peří na temeni, popustí křídla a vydává zvláštní luskavé zvuky. Samec je větší než samice (Hudec, 1983).

4 Materiály a metodika

4.1 Výběr modelových druhů ptáků a výchozího biologického materiálu

Genomickou DNA vhodnou pro následné molekulární analýzy je možné izolovat z různého biologického materiálu. Lze použít tělesné tkáň ptáků jako je například: svalovina, kožní buňky, krev, nebo krevní sraženina. Při řešení bakalářské práce jsem vybral několik druhů ptáků, u kterých bylo možné získat velké množství tkání a tím zajistit dostatečné množství genomické DNA, která je nezbytná pro optimalizaci metodických postupů vedoucích k aplikaci molekulárních markerů. Proto jsem u domestikovaných druhů, (kur domácí, kachna domácí, husa domácí a krocan domácí) použil jako výchozí biologický materiál tkáň krční svaloviny, srdeční svaloviny, žaludeční svaloviny a jater. U ostatních druhů byla DNA získána neinvazivním způsobem. Pro izolaci DNA byly použity letky, nebo ocasní pera s krevní sraženinou, nebo čerstvě rostoucí pera z oblasti hřbetu, která obsahovala velké množství krve. Přehled hodnocených druhů ptáků a typu výchozího biologického materiálu je uveden v následující tabulce 2.

Tabulka 2: Hodnocené druhy ptáků a použitý materiál pro izolaci DNA – 1. část

Český název	Vědecký název	Biologický materiál	Původ vzorku	Počet samic	Počet samců
agapornis růžohrdlý	<i>Agapornis roseicollis</i>	rostoucí brk s krví	soukromý chovatel, Česká republika	7 *	10
andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	rostoucí brk s krví	soukromý chovatel, Česká republika	1 *	1
ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>	krevní sraženina v brku letky	soukromý chovatel, Česká republika	1 *	0

Tabulka 2: Hodnocené druhy ptáků a použitý materiál pro izolaci DNA – 2. část

Český název	Vědecký název	Biologický materiál	Původ vzorku	Počet samic	Počet samců
havran polní	<i>Corvus frugilegus</i>	krevní sraženina v brku letky	Kladno, Česká republika	3 *	2
holub domácí	<i>Columba livia f. domestica</i>	rostoucí brk s krví	soukromý chovatel, Česká republika	2 *	2
holub hřivnáč	<i>Columba palumbus</i>	krevní sraženina v brku letky	Praha, Stromovka, Česká republika	6 *	4
hrdlička zahradní	<i>Streptopelia decaocto</i>	krevní sraženina v brku ocasního pera	Kladno, Česká republika	2 *	2
husa domácí	<i>Anser anser f. domesticus</i>	jaterní buňky	Goldenfood, Maďarsko	4 *	6
kachna divoká	<i>Anas platyrhynchos</i>	krevní sraženina v brku letky	Praha, Stromovka, Česká republika	3 *	2
kachna domácí	<i>Anas platyrhynchos f. domestica</i>	krční svalovina	Vodňanská kachna, Česká republika	6 *	4
kachna domácí	<i>Anas platyrhynchos f. domestica</i>	jaterní buňky	Vodňanská kachna, Česká republika	7	3
kakadu růžový	<i>Eolophus roseicapilla</i>	rostoucí brk s krví	soukromý chovatel, Česká republika	1 *	0
krocán domácí	<i>Meleagris gallopavo f. domestica</i>	krční svalovina	Gutstetten, Německo	7 *	3

Tabulka 2: Hodnocené druhy ptáků a použitý materiál pro izolaci DNA – 3. část

Český název	Vědecký název	Biologický materiál	Původ vzorku	Počet samic	Počet samců
krocan domácí	<i>Meleagris gallopavo f. domestica</i>	jaterní buňky	Prominent, Česká republika	4	6
křepelka čínská	<i>Coturnix chinensis</i>	rostoucí brk s krví	soukromý chovatel, Česká republika	1 *	1
kur domácí	<i>Gallus gallus f. domesticus</i>	krční svalovina	Vocílka, Česká republika	4	6
kur domácí	<i>Gallus gallus f. domesticus</i>	srdeční svalovina	Vocílka, Česká republika	7 *	3
kur domácí	<i>Gallus gallus f. domesticus</i>	žaludeční svalovina	Vocílka, Česká republika	5	5
labuť velká	<i>Cygnus olor</i>	krevní sraženina v brku letky	Praha, Smíchov, Česká republika	3 *	2
papoušek mniší	<i>Myiopsitta monachus</i>	rostoucí brk s krví	soukromý chovatel, Česká republika	4 *	2
racek šedokřídlý	<i>Larus glaucescens</i>	krevní sraženina v brku letky	ZOO Praha, Česká republika	1 *	0
žako šedý	<i>Psittacus erithacus erithracus</i>	krevní sraženina v brku letky	soukromý chovatel, Česká republika	1 *	0
žako šedý	<i>Psittacus erithacus erithracus</i>	krevní sraženina v brku ocasního pera	soukromý chovatel, Česká republika	0	1

V předchozí tabulce jsou * označeny druhy, respektive samice, jejichž DNA byla izolována z konkrétního biologického materiálu a která byla následně použita pro sekvenování PCR markerů genu CHD1.

Pera uvolněná přirozeným pelicháním byla u druhů chovaných soukromými chovateli získána od individuálně chovaných jedinců, se známým pohlavím (žako šedý a ara ararauna. U ptáků volně žijících v přírodě, byla pera získána sběrem v přirozených podmínkách podzimního pelichání. Pera hřivnáče byla získána z prostor pražské Stromovky, kde holub hřivnáč patří mezi dominující zástupce měkkozobých. Pera hrdličky zahradní byla získána ze soukromé zahrady v Kladně, kde tyto ptáky celoročně žijí v ochočeném stavu. Letky havranů byly získány sběrem pod stromy s hnízdící kolonií v blízkosti kladenského gymnázia. Letka racka šedokřídlého pochází ze Zoo Praha, kde jsou tyto ptáky chováni v průchozí voliére. Během návštěvy této voliéry byla získána letka, kterou si samice přímo uvolnila během úpravy peří.

Na obrázku 15 je znázorněn odběr krevní sraženiny z brku čerstvě vypadlého pera ary ararauny.

Obrázek 15: Krevní sraženina v brku ary ararauny



4.2 Izolace genomické DNA

Při izolaci DNA z čerstvých tkání (Křční, srdeční, žaludeční svalovina, jaterní buňky a čerstvě rostoucí pero) byla DNA izolována z 50 mg biologického materiálu. Tyto tkáně byly odebrány z drobů, zakoupených jako lidská potravina. Proto před vlastním odběrem tkáně bylo provedeno opláchnutí výchozího materiálu ve fyziologickém roztoku a následné osušení povrchu sterilní gázou. U suchých krevních sraženin, které byly odebrány z vypadlých per, byla pro izolaci DNA použita celá sraženina, jejíž hmotnost nebyla z důvodu možné kontaminace stanovována.

Pro izolaci DNA ze všech typů biologického materiálu byl použit komerčně vyráběný kit NucleoSpin® Tissue XS (Machery – Nagel). Pro izolaci byla použita konkrétní modifikace, která je výrobcem kitu určena pro izolaci genomické DNA z částí myších ocásků. Lyze biologického materiálu v pufru T1 probíhala po dobu 12 hodin.

4.3 Hodnocení kvality a kvantity izolované DNA

Extrahovaná genomická DNA byla z hlediska vysokomolekularity hodnocena na základě separace v jednoprocetním agarózovém gelu v 1 x TBE (Sambrook et al. 1989) pufru v elektroforetické cele SubCell (BioRad). Elektroforeogramy byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu. Složení pufru je součástí přílohy bakalářské práce. Při testovací elektroforéze bylo použito konstantní napětí 120V. Elektroforéza probíhala po dobu 60 min. Pro vyhodnocení elektroforeogramu byla použita digitální kamera systému GelDoc (BioRad) a program QuantityOne (BioRad). Množství extrahované DNA bylo hodnoceno pomocí UV spektrofotometru NanoPhotometer (Implen). Tento přístroj stanovil koncentraci izolované DNA na základě poměru absorbancí A260/A280. Současně byl hodnocen i poměr absorbancí A260/A230, který koresponduje s možnými kontaminacemi izolované DNA různými organickými látkami. Získané údaje nebyly statisticky vyhodnoceny. Informace o koncentraci izolované DNA byly použity pro naředění extrahované DNA na konstantní koncentraci 10 ng μl^{-1} u všech analyzovaných vzorků. Pro ředění extrahované DNA byl použit pufr 1x TE.

4.4 PCR marker pohlaví ptáků při použití markeru 2550F – 2718R podle Fridolfsson a Ellegren (1999)

4.4.1 Podmínky amplifikace markeru

Vznik tohoto markeru a nasedání primerů 2550F – 2718R, bylo popsáno v literárním přehledu bakalářské práce. Pro amplifikaci byl použit pár primerů, který navrhli Fridolfsson a Ellegren (1999) s následujícími sekvencemi:

2550F: 5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'

2718R: 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'

Složení amplifikační reakce je uvedeno v následující tabulce 3.

Tabulka 3: Složení PCR reakce pro amplifikaci části intronu genu CHD1 při použití primerů 2550F – 2718R

Složka	Koncentrace
DNA	20 ng.12,5 μl^{-1}
Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	2 mM
KCl	50 mM
2550F	0,4 μM
2718R	0,4 μM
dNTP	200 μM
BSA	5 μg .12,5 μl^{-1}
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
Taq polymeráza (Roche)	1 U . 12,5 μl^{-1}
Objem	12,5 μl
pH	8,3

Pro amplifikaci byl použit termocykler C1000 Thermal Cycler (BioRad). Teplotní profil amplifikace je uveden v následující tabulce. Termocykler je znázorněn na obrázku 16.

Tabulka 4: Teplotní a časový profil amplifikace PCR markeru při použití primeru 2550F – 2718R

Počáteční denaturace	95 °C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	94 °C	30 sekund	35 cyklů
Annealing	48 °C	30 sekund	
Prodlužování	72 °C	60 sekund	
Závěrečné prodlužování	72 °C	420 sekund	1 cyklus

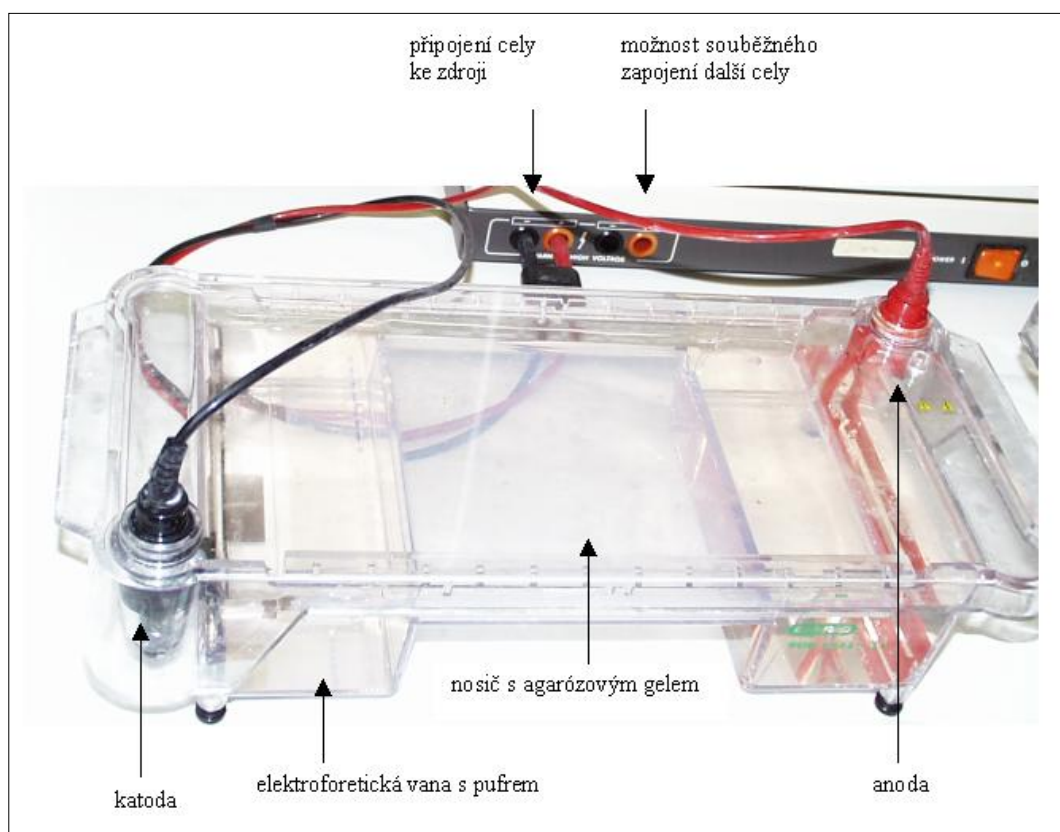
Obrázek 16: Termocykler C1000 Thermal Cycler (BioRad)



4.4.2 Detekce polymorfismů na základě gelové elektroforézy

Pro detekci délkových polymorfismů byla použita separace ve 2,5 % agarózovém gelu v prostředí 1x TBE pufru. Pro elektroforézu byla použita shodná elektroforetická cela i dokumentační systém, jako v případě testovací gelové elektroforézy. Vlastní separace probíhala po dobu 90 minut při konstantním napětí 120V. Použitá elektroforetická cela je znázorněna na následujícím obrázku 17.

Obrázek 17: Elektroforetická cel SubCell (BioRad)



4.4.3 Sekvence Z a W haplotipů markeru genu CHD1

Pro sekvenaci byly použity vzorky jedinců samičího pohlaví u všech hodnocených druhů ptáků. Původ amplifikované DNA, která byla použita pro sekvenační analýzy je uveden v tabulce 11. Protože pro sekvenaci byli použiti jedinci samičího pohlaví, PCR produktem byly vždy dva fragmenty. Větší z fragmentů odpovídal amplifikovanému markeru gonozómu Z a menší z fragmentů odpovídal gonozómu W. Z důvodů existence dvou fragmentů v jedné PCR reakci bylo nezbytné provést takzvanou purifikaci fragmentů na základě elektroforetické separace.

Izolace amplikonu z agarózového gelu

Pro elektroforetickou separaci v tomto experimentu byl použit naprosto stejný metodický postup, který je uvedený v kapitole 4.4.3. Po 90 min byly oba amplikony zřetelně odděleny. Jednotlivé amplikony byly pomocí sterilního skalpelu vyříznuty z gelu a umístěny do sterilních polypropylenových zkumavek. Pro vlastní izolaci fragmentu z gelového bločku byl použit MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen). Použitý postup se plně shodoval s návodem, který uvádí výrobce kitu. U izolovaných fragmentů DNA byla provedena

kvantifikace DNA podle shodného metodického postupu, který je uveden v kapitole 4.3. Extrahovaná DNA byla u všech vzorků naředěná na koncentraci $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Pro naředění extrahovaných vzorků byla použita sterilní ddH_2O .

Příprava sekvenační reakce

Pro sekvenaci PCR amplikonu byl použit BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Jednotlivé složky a jejich koncentrace v sekvenační reakci jsou uvedeny v následující tabulce 5. Každý amplikon byl sekvenován vždy od F a R primeru a to vždy ve dvouh opakování.

Tabulka 5: Složení sekvenační reakce pro hodnocení amplikonu genu CHD1 u ptáků

Složka	Objem	Koncentrace
PCR produkt ($5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	3 μl	$15 \text{ ng} \cdot 20 \mu\text{l}^{-1}$
5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems)	4 μl	1x
Primer F resp. R ($1 \text{ pikomol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	3,2 μl	$3,2 \text{ pikomolů} \cdot 20 \mu\text{l}^{-1}$
Terminator Ready Reaktion Mix (Applied Biosystems)	2 μl	$2 \mu\text{l} \cdot 20 \mu\text{l}^{-1}$

Příprava produktů sekvenační reakce pro fragmentační analýzu

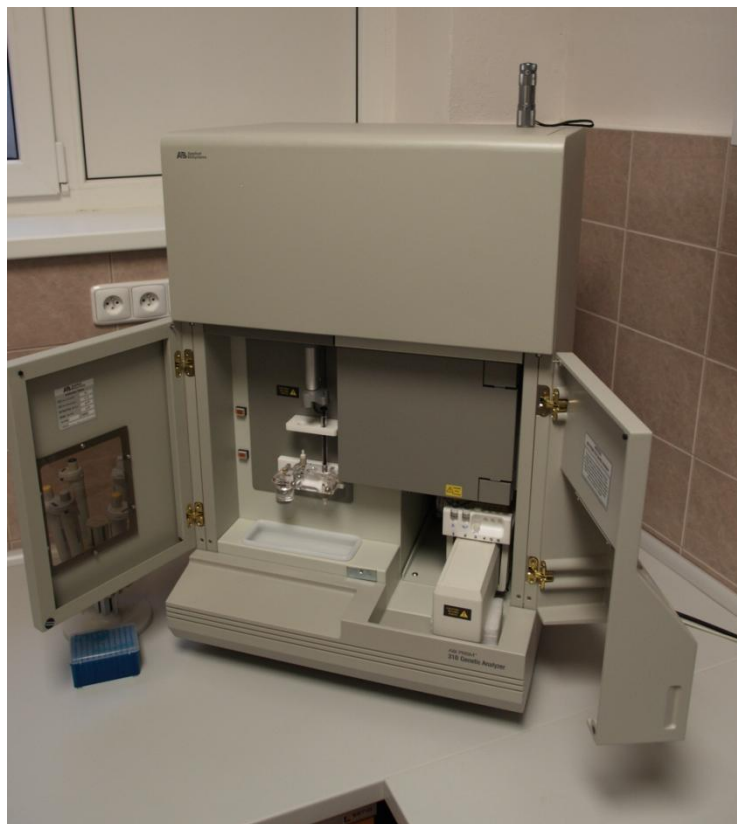
Produkty sekvenační reakce je nezbytné před fragmentační analýzou purifikovat. Pro vysrážení produktu sekvenační reakce byl použit následující postup. K celému objemu sekvenační reakce byly přidány 2 μl roztoku glykogenu o koncentraci $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, 2 μl 3 M octanu sodného a 50 μl 96% nedenaturovaného etanolu. Získaná směs byla po důkladném promíchání ponechána po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Během této doby došlo k vysrážení produktů sekvenační reakce. Následovalo odstředění vzorků v chlazené stolní centrifuze 5430 R (Eppendorf) vzorků při 13200 otáčkách $\times \text{min}^{-1}$ při teplotě 15°C . Pro odsátí supernatantu byla použita pipeta a precipitát na dně zkumavky byl propláchnut 250 μl 70% nedenaturovaného etanolu. Následovalo odstředění vzorků za stejných podmínek, jako v posledním postupu. Proces oplachování precipitátu 70% etanolem a následné odstředění byl ještě jednou zopakován. Zkumavky s precipitátem byly umístěny do vyhřívaného bloku Bio TDB – 120 (Biosan), kde byly při teplotě 50°C po dobu 45 min důkladně vysušeny. Takto získané vzorky byly následně rozpuštěny v 15 μl Hi-Di formamidu. Před vlastní kapilární elektroforézou byl veškerý objem rozpuštěných vzorků přenesen pipetou do

polypropylenových stripů, které byly umístěny do termocykleru C100™ Thermal Cycler (BioRad), kde probíhala denaturace vzorků při teplotě 95°C po dobu 5 minut.

Vyhodnocení sekvenační reakce pomocí kapilární elektroforézy

Pro vyhodnocení fragmentů vzniklých při sekvenační reakci byl použit genetický analyzátor ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems), který je znázorněn na obrázku 18.

Obrázek 18: Genetický analyzátor ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)



V následující tabulce 6 je uveden modul použitý polymer, filtry a ostatní podmínky použité při sekvenaci.

Tabulka 6: Nastavení genetického analyzátoru při sekvenaci markeru genu CHD1 u ptáků

Parametry separace	Parametry
Délka kapiláry (cm)	50
Modul	SeqPOP6(1ml)E
Polymer	POP 6
Virtuální filtr	E
Doba nástřiku (s)	30
napětí při nástřiku (kV)	2,5
teplota při separaci (°C)	50
Napětí při separaci (kV)	11,3
Doba separace (minuty)	120

Během sekvenace byla automaticky zaznamenávána výstupní data. Tato data byla převedena do podoby chromatogramů, které byly následně automaticky hodnoceny programem DNA Sequencing Analysis Software ver. 5.1 (Applied Biosystems).

4.4.4 Statistické a bioinformatické vyhodnocení sekvenčních polymorfismů

Pro vyhodnocení získaných sekvencí byl použit bioinformatický program BioEdit - Sequence Alignment Editor version 7.0.9.0 (Hall, 1999). Pro porovnání získaných sekvencí byly použity dvě mezinárodní nukleotidové databáze – NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a Esembl Genom Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>). Pro porovnání sekvenčních podobností byl použit program BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

V získaných amplikonech byla identifikována sekvence, která odpovídá intronu a části exonových sekvencí, které amplifikovaný intron lemují. U získaných sekvencí byla provedena simulace postranskripční úpravy – sestřihu RNA a kódující sekvence lemujících exonů byly

spojeny s cílem sestavit u jednotlivých druhů ptáků parciální CDS. Vyhledání exonových a intronových sekvencí bylo provedeno na základě modelové sekvence u kura domácího, která je zveřejněna v databázi NCBI. Na obrázcích 19 a 20 jsou vyznačeny intronové oblasti a CDS u tohoto druhu.

Na základě sekvencí CDS byla predikovaná aminokyselinová sekvence části genu CHD1. Pro predikci sekvence aminokyselin byl použit program ExPasy – (<http://www.expasy.org/>).

Sekvenční podobnosti byly zjišťovány nejen mezi druhy ptáků, které byly sekvenovány při řešení bakalářské práce, ale rovněž i s ostatními zástupci studovaných čeledí, které jsou zpracovány v databázi NCBI. Porovnání sekvenčních podobností, bylo provedeno podle následujícího schématu:

- Porovnání celých amplikonů vymezených primery 2550F a 2718R
- Porovnání pouze intronu
- Porovnání CDS sekvencí
- Porovnání predikovaných polypeptidových řetězců.

Pro porovnání výše zmíněných sekvencí byl použit program ClustaX (Thompson et al. 1997). Sekvence byly porovnány na základě „Multiple – Alignment“ podle postupu, který uvádí Jeanmougin et al. 1998). Při porovnání sekvencí byly použity následující parametry:

- Gap Opening: 15
- Gap Extension: 2
- Delay Divergent Sequences (%): 30
- DNA Transition Weight: 0,5
- Random Number Generator Seed: 1000
- Number of Bootstrap Trials: 1000

Výstupem porovnání sekvencí byly datové soubory s příponou phb, které byly použity pro sestavení fylogramů pomocí programu TreeView 1.6.6, který pracuje na principu softwaru Phylip _ 1.

Obrázek 19: Exonové a intronové části ampliconu gonozumu Z u kura domácího –
upraveno podle NCBI

Gallus gallus chromobox-helicase-DNA binding protein Z (CHDZ) gene, partial cds

GenBank: GU132943.1

LOCUS GU132943 593 bp DNA linear VRT 13-OCT-2010

DEFINITION Gallus gallus chromobox-helicase-DNA binding protein Z (CHDZ) gene, partial cds.

ACCESSION GU132943

VERSION GU132943.1 GI:308229959

KEYWORDS .

SOURCE Gallus gallus (chicken)

ORGANISM *Gallus gallus*
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Archosauria; Dinosauria; Saurischia; Theropoda; Coelurosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae; Phasianinae; Gallus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 593)
AUTHORS Zhao, S.
TITLE An efficient PCR method for sex identification in birds of Phasianidae
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 593)
AUTHORS Zhao, S.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (22-OCT-2009) College of Life Sciences, Sichuan University, 24 South Section 1, Yihuan Road, Chengdu, Sichuan 610064, P.R. China

gene <1..>593
/gene="CHDZ"

mRNA join(<1..112,537..>593)
/gene="CHDZ"
/product="chromobox-helicase-DNA binding protein Z"

CDS join(<1..112,537..>593)
/gene="CHDZ"
/codon start=2
/product="chromobox-helicase-DNA binding protein Z"
/protein id="ADO24434.1"
/db xref="GI:308229960"
/translation="LLIRLRERGNRVLIFSQVMRMLDILAEYLKYRQFPFQRLDGSIK GELRKQALDHFN"

ORIGIN

```

1 gctactgatt cgtctgcgag aacgtggcaa cagagtctctg atttctctc agatggtgag
61 gatgctggac atcctagcag aatatctgaa gtatcgccag tttcccttcc aggtaacaat
121 ctcgagtaac caagaggtct tgatcctgaa ctaagaaaa atcatgttta tattctgagg
181 gtgacatggt ggagtgagct gtacagatgt cgtgaaatct ccattctctg tgatacataa
241 aagtcaactt ggcactgtcc tggttagcct gctgtagcag accttgcttg gaaacaggac
301 aagatgacct ctagaggtcg ttgccagtat ttcaaccatc tgtgattatt tgatcttcac
361 cattttgctt aagaaaagaa agcaactttc agttaaaaag attatgtgaa caaatatggt
421 aacattcctt cttttgttc cttcacattg ctgttttatc agttaaaaag tcaagttact
481 gtgatgggaa tatagctaaa gaattacttt tagactgtag ttttcaatct ctttagagac
541 ttgatggatc aataaaaggg gaattgagga agcaagcact ggatcatttc aat

```

Obrázek 20: Exonové a intronové části ampliconu gonozomu W u kura domácího –
upraveno podle NCBI

Gallus gallus chromobox-helicase-DNA binding protein W (CHDW) gene, partial cds

GenBank: GU132944.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS GU132944 447 bp DNA linear VRT 13-OCT-2010
DEFINITION Gallus gallus chromobox-helicase-DNA binding protein W (CHDW) gene,
partial cds.
ACCESSION GU132944
VERSION GU132944.1 GI:308229961
KEYWORDS .
SOURCE Gallus gallus (chicken)
ORGANISM *Gallus gallus*
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Archosauria; Dinosauria; Saurischia; Theropoda; Coelurosauria;
Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae; Phasianinae; Gallus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 447)
AUTHORS Zhao, S.
TITLE An efficient PCR method for sex identification in birds of
Phasianidae
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 447)
AUTHORS Zhao, S.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (22-OCT-2009) College of Life Sciences, Sichuan
University, 24 South Section 1, Yihuan Road, Chengdu, Sichuan
610064, P.R. China
gene <1..>447
/gene="CHDW"
mRNA join(<1..112,391..>447)
/gene="CHDW"
/product="chromobox-helicase-DNA binding protein W"
CDS join(<1..112,391..>447)
/gene="CHDW"
/codon start=2
/product="chromobox-helicase-DNA binding protein W"
/protein id="ADO24435.1"
/db xref="GI:308229962"
/translation="LLIRLRERGNRVLIFSQVMRMLDILAEYLKYRQFPFQRLDGSIK
GELRKQALDHFN"
ORIGIN
1 gttactgatt cgtctacgag aacgtggcaa cagagtactg atttctctc agatggtgag
61 gatgctagac atcctagcag aatacttgaa gtatcgtcag tttcctttc aggtaagaat
121 tttgatggta gtagccaaga agccttgatc ttgcccactt tatcttaagt aaaagtgtcc
181 tttctgtaga aaagacttct aaaagttaa ttttatgtat agaaaaagac tggcaattac
241 tatgggtgta ggtgtgcat tattctcctc ctcctcctc cccccattc ctccccttgc
301 cctcagttgt tttggcaatt gagtattcag gttgctctga ttagaatata gtagagttc
361 ctttttaact gtaatatattg atctctttag agacttgatg gatcaataaa aggagaactg
421 aggaaacaag cactggatca tttcaat

4.5 PCR marker pohlaví ptáků při použití markeru P2 - P8 podle Griffiths et al (1998)

4.5.1 Podmínky amplifikace markeru

Vznik tohoto markeru a nasedání primerů P2 a P8 bylo popsáno v literárním přehledu bakalářské práce. Pro amplifikaci byl použit pár primerů, který navrhli Griffiths et al (1998) s následující sekvencí:

P2: 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'

P8: 5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'

Složení amplifikační reakce je uvedeno v následující tabulce 7.

Tabulka 7: Složení PCR reakce pro amplifikaci části intronu genu CHD1 při použití primerů P2 – P8

Složka	Koncentrace
DNA	20 ng.12,5 μl^{-1}
Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	2 mM
KCl	50 mM
P2 označen pomocí 6-FAM	0,4 μM
P8	0,4 μM
dNTP	200 μM
BSA	5 μg .12,5 μl^{-1}
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
Taq polymeráza (Roche)	1 U . 12,5 μl^{-1}
Objem	12,5 μl
pH	8,3

Pro amplifikaci byl použit termocykler C1000 Thermal Cycler (BioRad). Teplotní profil amplifikace je uveden v následující tabulce 8.

Tabulka 8: Teplotní a časový profil amplifikace PCR markeru při použití primeru P2 – P8

Počáteční denaturace	95 °C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	94 °C	30 sekund	35 cyklů
Annealing	57 °C	30 sekund	
Prodlužování	72 °C	60 sekund	
Závěrečné prodlužování	72 °C	420 sekund	1 cyklus

4.5.2 Detekce polymorfismů na základě kapilární elektroforézy

Amplifikovaný marker byl před separací pomocí kapilární elektroforézy naředěn sterilní ddH₂O. Protože při kapilární elektroforéze byla současně detekována i velikost amplifikovaného fragmentu, byl každý vzorek doplněn velikostním standardem GeneScan™-600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems). Kapilární elektroforéza pracuje na principu separace denaturovaných jednovláknových fragmentů DNA. Z těchto důvodů byl ke každému vzorku přidán Hi-Di formamid (Applied Biosystems). Způsob ředění vzorků je uveden v následující tabulce 9.

Tabulka 9: Ředění amplifikovaného markeru před kapilární elektroforézou

Ředění PCR		Vzorek pro fragmentační analýzu		
PCR produkt (μl)	H ₂ O (μl)	Ředěný PCR produkt (μl)	LIZ 600 (μl)	Hi-DI formamid (μl)
1	99	1	0,2	12

Naředěné vzorky byly následně tepelně denaturovány při teplotě 95°C po dobu 10 minut a následně ochlazeny na teplotu 4°C. Pro denuraci vzorků byl použit termocykler C1000™ Thermal Cycler (BioRad).

Vlastní kapilární elektroforéza byla provedená ve stejném genetickém analyzátoru, jako který byl použit pro sekvenaci - ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Podmínky kapilární elektroforézy jsou uvedeny v následující tabulce 16.

Tabulka 10: Podmínky fragmentační analýzy markerů genu CHD1 u ptáků

Parametry separace	Multiplex
Délka kapiláry (cm)	36
Modul	GS STR POP4 (1ml) G5
Polymer	POP4
Virtuální filtr	G5
Doba nástřiku (s)	5
Napětí při nástřiku (kV)	15
Teplota při separaci (°C)	60
Napětí při separaci (kV)	15
Doba separace (minuty)	25

Data, která genetický analyzátor automaticky zaznamenával, byla následně zpracována programem GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems). Výstupem tohoto programu byly chromatogramy, ve kterých byly automaticky odečteny velikosti (bp) jednotlivých píků, které odpovídají velikostem amplifikovaných fragmentů.

5 Výsledky

5.1 Hodnocení kvality a kvantity izolované DNA

Z metodické části bakalářské práce vyplývá, že pro izolaci DNA byly použity 4 zcela odlišné typy biologického materiálu – různé tyby svalovin, jaterní buňky, čerstvě rostoucí pero s krví a krevní sraženina v přirozeně vypadlém peru. Cílem bakalářské práce nebylo statistické vyhodnocení vlivu biologického materiálu na množství a kvalitu izolované DNA. Přesto v této části práce bych rád uvedl alespoň průměrné hodnoty, rozsah variability získaného množství DNA. Získané údaje byly spočítány jako průměr ze všech použitých druhů ptáků:

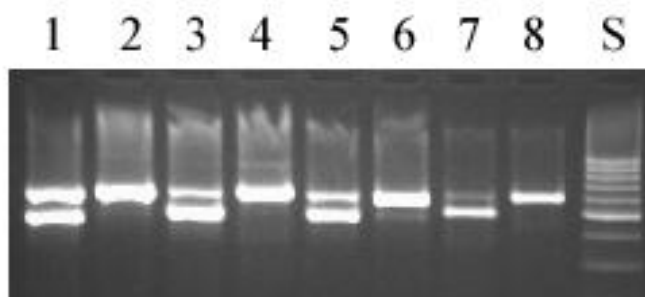
- krční svalovina: 82 ng DNA z 1mg tkáně, $V_k = 6,3 \%$
- srdeční svalovina: 96 ng DNA z 1mg tkáně, $V_k = 9,2 \%$
- žaludeční svalovina: 71 ng DNA z 1mg tkáně, $V_k = 11,5 \%$
- jaterní buňky: 113 ng DNA z 1mg tkáně, $V_k = 5,7 \%$
- rostoucí pero s krví: 65 ng DNA z 1mg tkáně, $V_k = 14,8 \%$
- krevní sraženina v brku: 52 ng DNA z 1 sraženiny, $V_k = 40,6 \%$.

U všech vzorků bylo provedeno stanovení poměru A260/A280. Průměrná hodnota u všech hodnocených vzorků dosáhla hodnoty 1,91 ($V_k = 8,5 \%$). Byla stanovena rovněž průměrná hodnota poměru A260/A230, která byla rovna 2,08 ($V_k = 9,3 \%$). Tyto parametry charakterizují čistou DNA bez výrazného množství kontaminací způsobených organickými sloučeninami. Na testovací elektroforéze bylo potvrzeno, že izolovaná DNA není poškozená fragmentací.

5.2.1 Výsledky elektroforetické detekce polymorfismu markeru 2550F – 2718R

Optimalizovaný amplifikační profil se ukázal jako vhodný pro použití tohoto markeru. U všech jedinců kde bylo předem známo pohlaví, docházelo u samic k amplifikaci dvou fragmentů. U všech samců byl vždy amplifikován pouze jeden fragment, který byl velikostně identický jako větší ampikon u samice. Na následujícím obrázku 21 je uveden vzorový elektroforeogram aplikace tohoto markeru u některých hodnocených ptáků z řádu hrabaví a vrubozobí.

Obrázek 21: Vzorový elektroforeogram PCR markeru genu CHD1 u vybraných ptáků z řádu hrabaví a vrubozobí



Komentář k obrázku: dráha 1 kur domácí samice, 2 kur domácí samec, 3 krocan domácí samice, 4 krocan domácí samec, 5 kachna domácí samice, 6 kachna domácí samec, 7 husa domácí samice, 8 husa domácí samec, S – hmotnostní standard Generuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

5.2.2 Výsledky sekvenace markeru 2550F – 2718R

Pro přesné stanovení velikosti ampikonu, bylo provedeno vyhodnocení sekvencí PCR fragmentu, odpovídajících gonozómům Z a W. Výsledky sekvenace jsou standartně uváděny v takzvaném fasta formátu. V následující části bakalářské práce je uveden přehled získaných sekvencí.

Gonozóm Z

>Gallus_gallus_f._domestica_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAATATCTGAAGTATCGCCAGTTTCCCTTCC
AGGTAACAATCTCGAGTAACCAAGAGGTCTTGATCCTGAACTTAAGAAAAATCAT
GTTTATATTCTGAGGGTGACATGGTGGAGTGAGCTGTACAGATGTCGTGAAATCT
CCATTCTCTGTGATACGTAAAAGTCAACTGGGCACTGTCCTGGTTAGCCTGCTGTA
GCAGACCTTGCTTGGAACAGGACAAGATGACCTCTAGAGGTCGTTCCCAGTATT
TCAACCATCTGTGATTATTTGATCTTCACCATTTTGCTTAAGAAAAGAAAGCAACT
TTCAGTTAAAAAGATTATGTGAACAAATATGTTAACATTCCTTCTTTTTGTTCCTT
CACATTGCTGTTTTATCAGTTAAAAGTCAAGTACTGTGATGGGAATATAGCTA
AAGAATTACTTTTAGACTGTAGTTTTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATA
AAAGGGGAATTGAGGAAGCAAGCACTGGATCATTTCAT

>Coturnix_chinensis_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAATATCTTAAATATCGCCAGTTTCCCTTCC
AGGTAACAATCTTGGGTAATCAAGAGGTCTTTATCCCGAACTTAAGAAAAATCAT
GTTTTAACTCTGAGGGTGACACAGTTTTAACTCTGAGGGTGACACAGAGTAATGC
AGTGAGTTGTTTAGATGTTGTGAAATATCCATTCTCTGTAACACTTAAAAGCCAA
CTGGGCATGGTCCTGGGCAGCCTGTTGTAGCAGACCTTGCTTGAGCACAGACAAG
ATGACCTCTAGAGTTCCTTGCCAATATTTTCATCCATCTGTGGTTATCTATCTTTACC
ATTTTGCTTATGAAAAGAAAACAACCTTGAATTGAAAAGATTATGTGAAGGAATA
TGTTAACATTCCTTCTTTTTGTTCCTTCACAGTACTGTATTACCAGTTGAAAAGTCT
GAAAAGTCAGGTTAATGTGATAGGAATATAGCTAAAGAATTACTTGTAGACTGTT
GCCTTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGAAGTGGAGAAACA
AGCACTGGATCATTTCAT

>Meleagris_gallopavo_f._domestica_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAATATCTAAAGTACCGGCAGTTTCCCTTCC
AGGTAATGATCTTGGTTAACCAAGAGGTCTTCATCCTGAACTTAAGAAAAATCAT
GTTTTTACTCTGAGGGTGGACGAGCAGTGGAGTATGTTGTTTACAGATGTTGTGAAA

TATCCATTCTCTGTGATACCTAAAAGCCAACCTGGGCGTGGTCTTGGGAAGCTTGC
TGTAGCAGGCCTTGGTTGAGCAGACAAGATGACTTTTAGAGGTCCTTCCAGTATT
TCAGCCATCTGTGATTATCTGTTCTTTACCATTTTGTTTAAGAAAAGAAAGCAACC
TTGAATTTAAAAGATTTTGTGAAGGAGCATGTTAACATTTCTTCTTTTTGTTCCTTC
ACATTGTTGTTTTATCAGTTGGAAAGTCAGGTTACTATGATGGGAATACAGCTAA
AGAATTACTTTCAGACTGTAGTTTTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAA
AAGGGGAATTGAGAAAGCAAGCACTGGATCATTTC AAT

>Cygnus_olor_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAGTACCTAAAGTATCGCCAGTTTCCCTTCC
AGGTAACAAGCCTAGTAGTCTTGATCCTGAATTTAAGAAAAATCTTTTCTGTACTC
TGAGGGTGACAGAGCAGTGGAGCAAGTTGTCCAGAGGTTGTGAAATCTCCATTCT
CTGTGATAATTTAAAAGCCAAGTGGACATGATCCTGGGTAACCTGCTCTAGTGGAC
CCTGTCTGAGCAGAGGTGTTAGACAAGATGACCTCCAGTGGTCCTTGCCAACCTC
AGCCTCTCTGCGATTATCTGATCTTTACCACTTTGCTTAATAAAAAGAGTGTCTTG
AATTA AAAAGATGATGTGAAGCACTAACATTCCTTTTTTTTCTTCACATTACTGTT
TTGGCTGTTGAGAATTCAAGTTGCTCTGATGAGAATATAGCATAAGAATTACTTTT
AAACTGTAGATATTCTAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAAAAAATGGAAAAT
TGAGGAAGCAAGCACTGGATCATTTC AAT

>Anser_anser_f._domesticus_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAGTACCTAAAGTATCGTCAGTTTCCCTTCC
AGGTAACAAGCCTAGTAGTCTTGATCCTGAATTTAAGAAAAATCTTTTCTTGACTC
TGAGTGTGACAGAGCAGTGGAGCAAGTTGTCCAGAGGTTGTGAAATCTCTGTTCT
CCATGATAATTTAAAAGAGAGGTGGACAAGATCCTGGGCAACCTGCTCTAGTGGA
CCGTGTCTGAGCAGAGGTGTTAGACAAGATGTCCTTGCCACCCTCAGCCTCTCTG
CCATTATCTGATCTTTACCACTTTGCTTAATAAAAAGGAGTGTCTTGAATTA AAAAC
ATGACATGAAGCATTAAACATTCCTTTTTTTTCTTCACATTACTGTTTTGGCTGTTGA
GAATTCAAGTTGCTATGATGAGAATATAGCATAAGAATTACTTTTAAACTGTAGT
ATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAAAAAATGGAAAATTGAGGAAGCAA
GCACTGGATCATTTC AAT

>Anas_platyrhynchos_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAGTACCTAAAGTATCGTCAGTTTCCCTTCC
AGGTAACAAGCCTAGTAGTCTTGATCTTGAATTTAAGAAAAATCTTTTCTTTACTC
AGAGTGTGACAGAGCAGTGGAGCAAGTTGTCCAGAGGTTGTGAAATCTCTGTTCT
CCATGATAATTAAGAGAGGTGGACAAGATCCTGGGCAACCTGCTCTAGTGGA
CCGTGTCTGAGCAGAGGTGTTAGACAAGATGTCCTTGCCACCCTCAGCCTCTCTG
CCATTATCTGATCTTTACCACTTTGCTTAATAAAGGAGTGTCCCTGAATTAAGAAC
ATGACATGAAGCATTAAACATTCCTTTTTTTTTCCTTCACATTACTGTTTTGGCTGTTGA
GAATTC AAGTTGCTATGATGAGAATATAGCATAAGAATTACTTTTAAACTGTAGT
ATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGAAACAA
GCACTGGATCATTCAAT

>Anas_platyrhynchos_f._domestica_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAGTACCTAAAGTATCGTCAGTTTCCCTTCC
AGGTAACAAGCCTAGTAGTCTTGATCTTGAATTTAAGAAAAATCTTTTCTTGACTC
AGAATGTGACAGAGCAGTGGAGCAAGTTGTCCAGAGGTTGTGAAATCTCTGTTCT
CCATGATAATTAAGAGAGGTGGACAAGATCCTGGGCAACCTGCTCTAGTGGA
CCGTGTCTGAGCAGAGGTGTTAGACAAGATGTCCTTGCCACCCTCAGCCTCTCTG
CCATTATCTGATCTTTACCACTTTGCTTAATAAAGGAGTGTCCCTGAATTAAGAAC
ATGACATGAAGCATTAAACATTCCTTTTTTTTTCCTTCACATTACTGTTTTGGCTGTTGA
GAATTC AAGTTGCTATGATGAGAATATAGCATAAGAATTACTTTTAAACTGTAGT
ATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGAAACAA
GCACTGGATCATTCAAT

>Larus_glaucescens_Z_ČZU

GTTACTGATTTGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAATATCTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AGGTAAGAATCTTGGTGGTAGTAGCCAAGAAGCTTTGATCTTGAGTACAAGAAA
AATCTTTTATTTACTTTGCTGGTGACAGAGCACTGGAACAAGTTGTCCAGAGATT
ATGGAATCTTCATACTCTGTGACATTCAAAAGCCGCCGGGACCTGCCCTTGGGCA
ACCTGCTTTAGCAGGAGTTAGACAAGATGACCTCCAGAGGTCCTTCCAGCTTTA

ACTGTTTTGTCATCATGGGATCTTTATCACTTTACTTAAGAAAAGACATAAGAAA
ATGTCATCTTTTTCTAGAAAGACTGGCAATTGCCATATTCTAAATAGTATTTTGAA
ATTAAACAGATGAACTAAAAAATAATATGAAGTGTTGTGTTACTTCAATTTTTTTA
CTCCACATAACAGTTTTGGCAGAGAATCCAAGTTGCTTTCATTTTAATATATTAT
AGGAATCTCTTTAACTATAATATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAA
AGGAGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT

>Columba_livia_f._domestica_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTCATTTCACAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCTTAGCAGAATATCTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTCA
GGTAAGAGTTGTGGTGGTAGTAGCCAAGAAGCTTTGACCTTGAATATAAGAAAA
ATCTTTTCTTTACTCTGAGGCTGACGGAGCACTGAACAAGTTGCCAGAGGTCAT
GGAATCTCCATCCTCTTTGACATTCAAAGCCACCTAGACATAACCGTGTGAAAC
CTGCTTTCACTGTCCCCACCTGAGTAGGGGACTTAGACAGGATGACCTCCAGCAG
TCCTTTCCAAATTCGACTGTTTTGCAATTATATGATCTTTACCACTTTGCTTAAGA
AAAGATAAAAGAAAATGTGGTTTTGTACTAAGTAGTATTTTGAAAGGAAATAGAT
TAATTTAAAATTATGTGCAGTGTTGCGTTACTTTTTTCACCTTCACATAACAGTT
TTAGCAGTTGAGAATTCAAGGTGCTCTGAGATTTTGTATAGAGAATATTAGAATA
TTTTGAATATAAAATTGCTTTTTAACTATAGTATTCAATCTCTTTAGAGACTTGAT
GGATCAATAAAAGGGGAACTAAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT

>Columba_palumbus_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTCATTTCACAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCTTAGCAGAATATCTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTCA
GGTAAGAGTTGTGGTGGTAGTAGCCAAGAAGCTTTGACCTTGAATGTAAGAAAA
ATCTTTTCTTTACTCTGAGGCTGACGGAGCACTGAACAAGTTGCCAGAGGTCAT
GGAATCTCCATCCTCTTTGACATTCAAAGCCAGCTGGACATAACCATGTGAAAC
CTGCTTTCACTGTCCCCACCTGAGTAGGGGACTTAGACAAGATGACCTCCAGCGG
TCCTTTCCAAATTCGACTGTTTTGCAATTATATGATCTTTACCACTTTGCTTAAGA
AAAGATAAAAGAAAATGTGGGTTTTGTTCTAGAAAGACTGGCAATTGCTATATACT
AAGTAGTATTTTGAAAGGAAATAGATTAATTTAAAATTATGTGCAGTGTTGCGT
TACTTTTTTCACCTTCACATAACAGTTTTAGCAGTTGAGAATTCAAGGTGCTCTGA
GATTTTGTATAGAGAATATTAGAATATTTTGAATATAAAATTGCTTTTTAACTATA

GTATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAAGGGGA ACTAAGGAAACA
AGCACTGGATCATTCAAT

>Streptopelia_decaocto_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTCATTCTCACAGATG
GTGAGGATGTTGGACATCTTAGCAGAATATCTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTCA
GGTAAGAGTTGTGGTAGTAGCCAAGAAGCTTTGACCTTGAATATAAGAAAAATCT
TTTCTTTACTCTGAGGCTGACGGAGCACTGGAACGAGTTGCCAGAGGTCATGGA
ATCTCCATCCTCCTTGACATTCAAAAGCCACCTGGACATAACCATGTGAAACCTG
ATTTAACTGTCCCCACCTGAGTAGGGGACTTAGGCAAGATGACCTCCAGCGGTCC
TTTCCAATTTCAACTGTTTTGCGATTATATGATCTTTACCCTTTGCTTAAGAAAA
GATAAAAGAAAATGTGGTTTTGTTCTAGAAAGACTGGCAATTGCTATATACTAAG
TAGTATTTTGAAAGGAAAGAGATTAATTTAGAAATTTTGTGCAGTGTTGCGTTAC
TTTTTTCACCTTCACGTAACAGTTTTTCGCAGTCAAGAATTCAAGGTGCTCTGAGAT
TTTGTATAGAGAGTATTAGAATATTTTGAATATAAAAATTGCTTTTTAACTATAGTA
TTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAAGGGGA ACTAAGGAAACAAG
CACTGGATCATTCAAT

>Ara_ararauna_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTCTCACAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCTTAGCAGAATATCTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTC
AAGTAAGAATCTTGGTGTAGTAGCCAAGAAGCTTTGATCTTGAATATTAGAAAA
TCTTTTCTTTATCTGAGGGTGACA ACTTCTTCAGAGGTTATGAGCTCTGTGACATT
CAGAAGCCACCTGGACATGACACTGGGCAACCTGCTATTGCTGTCCCAGTTAAG
TTGGGGAGTTAGACAACATCACCTCCAGAGGTCCCTTCCAACCTAAATCTGTTTT
GTGAATATGATCTGTATCACTTTGCTTAAGGGAAAGACACAAGAAAACATGTTCT
TTTCGATAAAAATCTGGCAATTGCTGTATGCTAAATAATAATTTGATGTTAAATAG
ATAAATTA AAAAGATAACAAGAATTGATACATCACAGGTTTTCTTTTTTCGTCACG
TAACAGGTTTGGCATTGAGAATTTGGGGTGCTCTGATTTTGAATATAGTAAAAG
AATTGCTTTTTAACTGTAGCGTTCAATCTCTTTAGAGGCTTGATGGATCAATAAAA
GGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTCAAT

>Myiopsitt_monachus_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCTTAGCAGAATACCTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AAGTAAGAATCTTGGTGTAGTAGCCAAGAAGCTTTGATCTTGAATATTAGAAAA
ATCTTCTTTTTATCTGAGGGTGACAGCTTGTTTCAGAGGATATGAGCTCTGTGACAT
TCAGAAGCCACATGGACATGACACTGGGCAACCTGTTTTTGCTGTCCCCAGTTAA
GCTGGGGACAATATCACCTCCGACCTAAATCTGTTTTGTGAATATGATCTGTACC
ACTTTTGAATATGATCTGTCCCTTCCAACCTAAATCTGTTTTGTGAATATGATCTG
TACCACTTTGCTTAAGAAAAGACATAAGAAAACATGTTCTTTTTTGATAAAAATCT
GGCAATTGCTGTATGCTAAATAACAATTTGATGTTAAATAGATGAATTAAAAAAA
ATACAGAAATTAATGCATCACAGGTTTTCTTTTTTTCTTCACATAACAGGTTTGGC
ATTTGAGAATTTGGGGTGCTCTGATTTTGAATATAGTATAAGAATTGCTTTTTAAC
TGTAGCATTCAATCTCTTTAGAGGCTTGACGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGA
AACAAGCACTGGATCATTTC AAT

>Psittacus_erithacus_erithacus_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCTTAGCAGAATATCTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AAGTAAGAATCTTGGTGGCAGTAGCCAAGAAGCTTTGATCTTGAATATTAGAAAA
ATCTTTTCTTTATCTGAGTGTGACAGCTTGTTTCAGAAGATATGAGCTCTGTGACAT
ATTCAGAAGCCACCTGGACATGACACTAGGCAACCTGCTTTTGCTGTCCCCAGTT
AAATTGGGGAGTTAGACAATGTCACCTCCTGAGGTCCCTTCCAACCTCATCTGTTT
TGTGAATATGATCTGTACCACTTCATTAAGAAAAGACACAAGGAAACATGTTCTT
TTTTGATAAAAATCTGCAATTGCTCTATGCTAAATAATAATTAATAAGTGCATCA
GTTCTGGTATTTTTTTAATTCATCACAGGTTTTCTTTTTTTTTCTTCACATAACGGG
TTTGGCAGTTGAGAAGTCAAGGTGCTCTGATTTTGAAGTATAGTATAAGAATTACT
TTTTAACTGTAGCATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGAA
TTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT

>Agapornis_roseicollis_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAGTATCTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AAGTAAGAATCTTGGTGGTAGTAGCCAAGAAGCTTTGATTTTAAATATTAGAAAA

ATCTTCTCTTTATCTGAGGATGACAACTTGTTTCAGATGATATGAGCACTATGACAT
TCAGAAGCCACCTAGACATGATGCTGGGCAACCTGCTTTTGCTGTCCCCAGTTAA
GTTGGGGAATTAGACAATATCATCTCCAGAAGTCCCTTCCAACCTCATCTGTTTTG
TGAATATGATCTGTATCACTTTGCTTAAGAAAAGACACAAGAAAATATGTTCTCT
TTTGATAAAAATCTGATAATTGCCATATGCTAAGTAATAATTCGATATTGAATAGA
TGCATTAATAAAAAATAACAAGAATTGATGCATCACAGGCTTTCTTTTTTACATAAC
AGGTTTGGCATTGAGAATTTGGGGTTCTCTGATTTTGAATATAGTATAAGAATTA
GTTTTTAACTGTAGCATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAAGGGG
AATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTCAT

>Eolophus_roseicapilla_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAATATCTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AAGTAAGAATCTTGGTGGTAGTAGCCAAGAAGCTTTGATCTTGAATATTAGAAAA
ATCTTCTCTTTATCTGAGGGTGACAAGTTGTTTCAGAGGTTATGAACTCTGTGACAT
TCAGAAGCCACCTGGACATGACGCTGGGCAGCCTGCTTTTGCTGTCCCCACTTAA
GTTGGGGAGTTAGACAATATCACCTCCAGAGGTCCCTTCCAACCTCAGCTGTTTT
GTGAATATGATCTGTACCACTTTTCTTAAGAAAAGACACAAGAAAACATGCCAGA
TTTTATCGAAAAAGAACAATTGCTATATGCTAAATAATAATTTGATGTTAAATAG
ATGAATTCAAAAAATAGAAGAATTGATGCATCACAGGTTTTCTTTTTTTCTTCACA
TAACATGTTTGGCATTGAGAATTCGGGGTGCTCTGATTTTGAATAGAGTATAAG
AATTTTTAACTGTAGCTTTCAATCTCTTTAGAGGCTTGACGGATCAATAAAAAGGG
GAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTCAT

>Melopsittacus_undulatus_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATG
GTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAATATCTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AAGTAAGAATGTTGGTGGTAGTAGCCAAGAAGCTTTGATCTTGAATATTAGAAAA
ATATTTTCTTTATCTGAGGGTGACAGCTTGTTTCAGAGGATATGAGCTCTGTGACAT
TCAGAAGCCACCTAGACATGATGCTGGGCAACCTGCTTTTGATGTCCCCAGTTAA
TTTGGGGAGTTAGACAATATCACCTCCAGAGGTCCCTTCCAACCTCATCTGTTTTG
CGAATATGATCTATATCACTTTGCTTAAGAAAAGACACAAGAAAACATGTTCTCT
TTTGATAAAAATCTGGCAATTGCTATATGCTAAATAATAATTTTATGTTAAGTAGAA
GAATTAATAAAAAATAACAAGTTTTCTTTTTTTCTTCACGTAACAGGTTTGGCATTGACA

ACTTGGGGTGCTCTGATTTTGAATATAGTATAAGAATTACTTTTTAACTGTAGCAT
TCAATCTCTTTAGAGACTTGACGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGC
ACTGGATCATTTC AAT

>Corvus_frugilegus_Z_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTCCTGATTTTCTCACAGATG
GTAAGGATGCTGGACATCCTGGCAGAATATCTGAAATATCGTCAATTCCCATTTC
AGGTAAGAACTTGCTGGTAATAGCAGCTAAGAAGCTTTGATCTTGAATATTAAG
AAAATCTTTTCTTTACTGTGAGGGTGTGAGAGCACTGGAACAGGTTGTCCAGAGG
TTATGGAATTTTGTCTCTTGTGGAGGTCCAAAAGCTACCTTGGCATGACCTTGGGC
AGCATGCTTTAGTTGTCCCTGTCTGAGTAGGGGATTTAGACGAGTTGACCCTCAG
CAGTCCCTTTCAGCTTTGTTTCGTGATTATGTGACCGTTACCCCTTCAATTA AAAAA
AAGTGGAAGAAAATGCATTCTTTTTCTAGAAGGGGACTGGCTCTATGATGAATGT
TATTTTGAAGTAAACAGATGAACTAAAAATTATGTGAGCTGTTTATTTACTTACT
TTTTTTTCCCCTTACATAACAGTTTCAGCAGCTGACAATTGAAGTTGCTCTGATT
TTGAATATAGTATAAAAATTATTTTTTAACTGTAGTTCTCAATCTCTTTAGAGACT
TGATGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT

Gonozóm W

>Gallus_gallus_f._domestica_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAATACTTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTC
AGGTAAGAATTTTGATGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTGCCACTTTATCTT
AAGTAAAAGTGTCCTTTCTGTAGAAAAGACTTCTAAAAGTTTAATTTTATGTATA
GAAAAAGACTGGCAATTA CTATGGTGTGAGGTGTTGCATTATTCTCCTCCTCCTCC
TTCCCCCCCATTCTCCTCCCTTGCCCTCAGTTGTTTTGGCAATTGAGTATTCAGGTTG
CTCTGATTAGAATATAGTATGAGTTCCTTTTTTAACTGTAATATTTGATCTCTTTAG
AGACTTGATGGATCAATAAAAGGAGAACTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC
AAT

>Coturnix_chinensis_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAATACTTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTC
AGGTAAGAATTTTGATGGTAGTAGCCAGGAAGCCTTGATCTTTGTCACCTTATATT
AAGTAAAAGTGTTCTTTCTGTAGAAAGACTTATAAAAGTTTAATTTTACGTATAG
AAAAAGACTGGCAATTAATGTTGGTGCAAAGTGTTGCATTATTCTGCTCCTTCCCC
CCCCATTCCTCCCCTTGCCCTCAATTGTTTTGTCAACTGTGTATTCAGGTTGCTCTG
ACTAGAATATAGTATGAGAGTTCCTTTTTAACTGTAATATTTGATCTCTTTAGAGA
CTTGATGGATCAATAAAAGGAGAACTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT

>Meleagris_gallopavo_f._domestica_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTAATGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAATATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTCA
GGTAAGGATTTTGATGGTAGTAGCCAAGAAGCTTTAATCTTTGACACTTTATCTTA
AGTAAAAGTGTCCTTTCTGTAAAAACACTTAAGAGTTTAATTTTATGTATAGAAA
AAGGCTGGCAATTAATGTTGGTGAAATGTTGCATTATTCTCCTCCTCCTCCTCCT
CCTTTCCCCCCTTCCTCCCCTTGCCCTCAATTCTTTTGGCAACTGAGTATGCATT
CAGGTTGCTCTGATTAGAATATAGTATGAGAGTTCCTTTTTAACTGTAGTATTTGA
TCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGAGAACTAAGGAAGCAAGCACTG
GATCATTTC AAT

>Cygnus_olor_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAATATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTCA
GGTAGGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTGCCACTTTAGCTTA
AGAAAACGAAAAGTGTCCTTTTTTTGTAGAAGGATTTATAAAAGTTTAATTTTATG
TACAGAAAAAGACGACTGACAATTAATGATAAATGGTGTTTTGAAATGAAA
CTGATAAATTAGAAAGGTGGTGAAAATGTTACATACTCTTCTCCTTGCCCCCTAA
TTGTTTTGGCAATTGAGATTTCAAGTTGCTCTGATTTGAATATAGTATGAGAGTTC
CTCTTTAACTGTAATATTTGATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGAG
AATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT

>Anser_anser_f._domesticus_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAATATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTCA
GGTAGGAATTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTGCCACTTTAGCTTA
AGAAAAGGAAAAGTGTCCTTTTTTTGTAGAAGGATTTATAAAAGTTTAATTTTATG
TACAGAAAAAGACTGACAATTACTATATGATAAATGGTGTTTTGAAATGAAA
CTGATAAATTAGAAAGGTGGTGTAATAATGTTACATTACTTTTTTCCTTGCCCCTAA
TTGTTTTGGCAATTGAGATTTCAAGTTGCTCTGATTTGAATATAGTATGAGAGTTC
CTCTTTAACTGTAATATTTGATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGAG
AATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT

>Anas_platyrhynchos_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAATATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTCA
GGTAGGAATTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTGCCACTTTAGCTTA
AGAAACGTAAAAGTGTCCTTTTTTAGTAGAAGGATTTATAAAAGTTTAATTTTATG
TACAGAAAAAGACTATATGATAAATGGTGTATTGAAATGAAAATGATAAATTAG
AAAGGTGTTACATAACTCTTCTCCTTGCCCCTAATTGTTTTGGCAATTGAGATTTT
AAGTTGCTCTGATTAGAATATAGTATGAGTGTTCCCTCTTTAACTGTAATATTTGAT
CTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGAGAATTGAGGAAACAAGCACTGG
ATCATTTC AAT

>Anas_platyrhynchos_f._domestica_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAATATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTCA
GGTAGGAATTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTGCCACTTTAGCTTA
AGAAACGTAAAAGTGTCCTTTTTTAGTAGAAGGATTTATAAAAGTTTAATTTTATG
TACAGAAAAAGACTATATGATAAATGGTGTTTTGAAATGAAAATGATAAATTAG
AAAGGTGTTACATTACTCTTCTCCTTGCCCCTAATTGTTTTGGCAATTGAGATTTT
AAGTTGCTCTGATTAGAATATAGTATGAGTGTTCCCTCTTTAACTGTAATATTTGAT
CTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGAGAATTGAGGAAACAAGCACTGG
ATCATTTC AAT

>Larus_glaucescens_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTTTTTCAGATG
GTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATTGTCAGTTTCCCTTTCA
GGTAAGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATTTTTTACCACTTTATTTTA
AGAAAAGTGTCCTTTTAATAGAAAAGATTTATGAAAGTTTAATTTTATGTACAGGA
AAAGACTGATTAATTAGAAAAGATTAAGTGTTACCTTACTTCCCCCCCCCAATT
GTTTTGGCAATTGAAAATTCAAGTTGCTCGGATTAATAATAGTAGGAGTTCCTTT
TTAACTGTATTATTCATCTCTTTAAAGGCTTGATGGATCAATAAAAGGGGAATTG
AGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT

>Columba_livia_f._domestica_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTTAGGATGCTAGACATATTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAATTTCCCTTTCA
GGTGAGAATTTTTCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTACCACTTTATCCTT
TTTGTAGATTTATGAAAGTTTAATTTTACATACAGGAAAAGACTGGCAATTAATG
CATGCTAAATAGTATTTTGAAGTTAACTGATGAATTAGAAAAGATGAAGTGTTTA
CATTACTTTTATTCCACCCCACCCCTCAGTTGTTTTGGCAATTGAGAATTAAAGT
TGCTCTGATTAGAATATAGAAGGAATTCCTTTTTAACTGTATTATTCAATCTCTTT
AGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATT
TCAAT

>Columba_palumbus_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTTTATCAGATG
GTGAGGATGCTAGACATATTAACAGAGTATTTGAAGTATCATCAATTTCCCTTTC
AGGTGAGAATTTTTCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTACCACTTTATCCT
TTTTGTAGATTTATGAAAGTTTAATTTTACATACAGGAAAAGACTGGCAATTAAT
GCATGCTAAATAGTATTTTGAAGTTAACTGATGAATTAGAAAAGATGAAGTGTTT
ACATTACTTTTATTCCACCCCACCCCTCAGTTGTTTTGGCAATTGAGAATTCAAG
TTGCTCTGATTAGAATATAGAAGAAATTCCTTTTTAACTGTATTATTCAATCTCTT
TAAAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCAT
TTCAAT

>Streptopelia_decaocto_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGGATGCTAGACATACTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAATTTCCCTTTC
AGGTGAGAATTTTCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTACCACTTTATCCT
TTTTGTAGATTTATGAAAGTTTAATTTTACATACAGGAAAAGACTGGCAATTAAT
GCATGCTAAATAGTATTTTGAAGTTAACTGATGAATTAGAAAGATGAAGTGTTT
ACATTACTTTTATTCCACCCCACCCCCTTGGTTGTTTTGGCAATTGAGAATTCAAG
TTGCTCTGATAAGAATATAGAAGGAATTCCTTTTTAACTGTATTATTCAATCTCTT
TAGAGGCTTGATGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCAT
TTCAAT

>Ara_ararauna_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTGCTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGAATGCTAGACATCCTAGCGGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AGGTAAGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCATTACCACTTTATCTT
AAGAAAAGTGTCTTTTTGAAGAAAGATTTATGAAAATTTATTTTATGTACAGG
AAAAGACTGGCAATTAATATGCTAAATAGTATTTTGAACAAAAGACTGATGAAT
TAGAAAGACTGTTACATTTCTCTTATCCCCCCCCCATTGTTTTGGCAATTGAGAT
TTCAAGTTGCTTCAATTAGAATATAGTAGGAGTTCCTTTTTAATTATGTTATTCAA
TATCTTTAGAGACTTGACGGATCAATAAAAGGAGAATTGAGGAAACAAGCACTG
GATCATTTCAT

>Myiopsitta_monachus_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTGCTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGAATGCTAGACATCCTAGCGGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AGGTAAGAATGTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCATTACCACTTTAAGA
AAAGTGTCTTTTTGAAGAAAGATTTATGAAAATTTATTTTATGTACAGGAAAAG
ACTGGCAAGTAATATATGCTAAATAGTATTTTGAACAAAAGACTGATGAATTAGAA
AGATTGTTACATACTCTTATCCCCCCCCCCCCATTGTTTTGGCAATTGAGATTT
CAAGTTGCTCCAATTAGAATATAGTAGGAGTTCCTTTTTAATTATGTTATTCAATA
TCTTTAGAGACTTGACGGATCAATAAAAGGAGAATTGAGGAAACAAGCACTGGA
TCATTTCAT

>Psittacus_erithacus_erithacus_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGAATGCTAGACATCCTAGCGGAGTATTTGAGGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AGGTAAGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCATTACCACTTTATCTT
AAGAAAAGTGTCTTTTTGAAGAAAGATTTATGAAAATTTTATTTTATGTACAGG
AAAAGACTGGCAATTACTATATGCTAAATAGTATTTTGAAACAAAACACTGATGAAT
TACAGAGATTGTTACATTACTCTTATCCCCCCCCCAATTGTTTTGGCAATTGAGA
TTTCAAGTTGCTTCAATTAGAATATAGTAGGAGTTCCTTTTTAATTATGTTATTCA
ATATCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGAGAATTGAGGAAACAAGCACT
GGATCAATAACAAT

>Agapornis_roseicollis_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGAATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AGGTAAGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCATTACCACTTTATCTT
AAGAAAAGTGTCTTTTTGAAGAAAGATTTATGAAAATTTTATTTTATGTACAGG
AAAAGACTGGCAATTGCTATATGCTAAATAGTATTTTGAAACAAAACACTGATGAAT
TAGAAAGATTGTTACATTACTCTTATTCCCCCCTTGTTTCGGCAATGGAGATTTTC
AAGGTGTTACAATTAGACTATAGTAGGAGTTCCTTTTTAATTATGTTATTCAATAC
CTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGAGAATTGAGGAAACAAGCACTGGAT
CATTCAAT

>Eolophus_roseicapilla_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTTTCAGATG
GTGAGAATGCTAGACATCCTAGCGGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTC
AGGTAAGGATTTTGGTGGTGGTAGCCAAGAAGCCTTGATCATTACCACTTTATCT
TAAGAAAAGTGTCTTTTTGTAGAAAGATTTATGAAAATTTTATTTTATGTACAGG
AAAAGACTGACAATTACTATATGCTAAATAGTATTTTGAAACAAAACACTGATGAAT
TAGAAAGATTGTTACATTACTCTTATCCCCCCCCCATTGTTTTGGCAATTGAGAT
TTCAAATTGCTCCAATTAGAATATAGTAGGAGTTCCTTTTTAATTATGTTATTCAA
TATCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGAGAATTGAGGAAACAAGCACTG
GATCATTCAAT

>Melopsittacus_undulatus_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATG
GTGAGAATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCGTTTC
AGGTAGGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAATCCTTGATCATTACCACTTTATCTT
AAGAAAAGTGTCCTTTTTTGAAGAAAGATTTCTGAAAATTTTATTTTATGTACAGG
AAAAGACTGGCAATTACTATATGCTAAATAGTATTTTGAAACAAAACACTGATGATT
TAGAAAGGTTGTTACGTTACTCTTATTCCCCCTCCCCCCCATTGTTTTAGCAATTG
AGATTTCAAGTTGCTCCAATTAGAATATAGTAGGAGTTCCTTTTTAATTATGTTAT
TCAATATCTTTAGAGACTTGACGGATCAATAAAAGGAGAATTGAGGAAACAAGC
ACTGGATCATTTC AAT

>Corvus_frugilegus_W_ČZU

GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTTTCAGATG
GTGAGGATGCTAGATATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTCA
GGTAAGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATTTTTACCATTTTATCTTT
AAAAAAAGTGTCCTTTTTTGTAGAAAGATTTATGAAAGTTTAATTTTTCTGTACAGT
AGAAGACTAGTGATTACTATATGCTTAATAGTATTTTGAAATTAACACTGATTAATT
GGAAGTGTTACATTATTCTTATTCCTCCCCCCCCCAATTGATTTGGCAATTGAGA
ATTCAAGTTGCTCTGAATAGGCTATAGTAGGAGTTCCTTTTTAACTGTATCATTCA
ATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACT
GGATCATTTC AAT

5.2.3 Stanovení velikosti amplikonu markeru 2550F – 2718R

Z výsledků sekvenační analýzy v uvedené předchozí kapitole, byly odečteny přesné velikosti amplikonu, které odpovídají Z respektive W alele genu CHD1. Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 11.

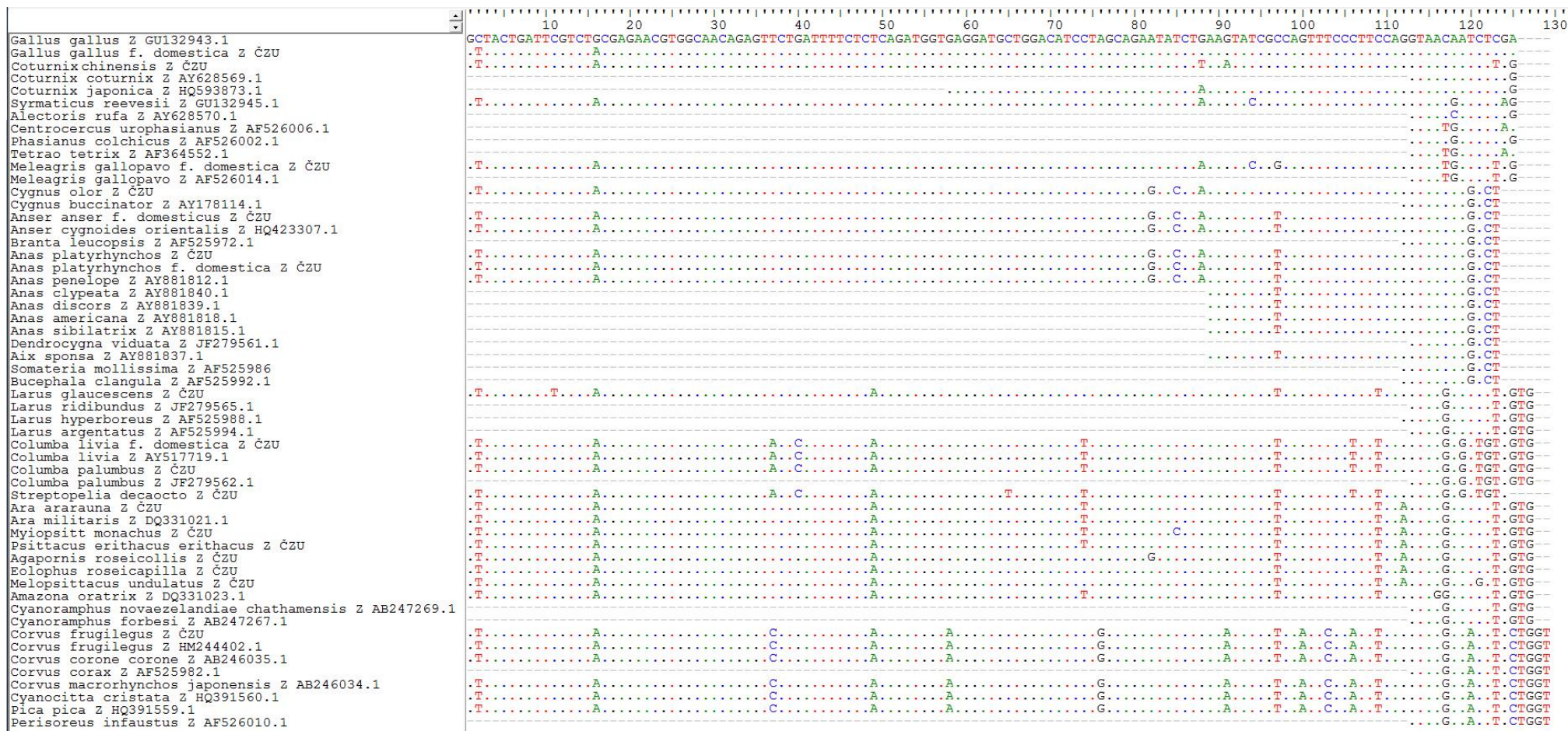
Tabulka 11: Velikosti ampliconů markeru 2550F – 2718R pro gonozómy Z a W

Český název	Vědecký název	Z (bp)	W (bp)
agapornis růžohrdlý	<i>Agapornis roseicollis</i>	640	451
andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	625	458
ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>	644	454
havran polní	<i>Corvus frugilegus</i>	662	458
holub domácí	<i>Columba livia f. domestica</i>	656	448
holub hřivnáč	<i>Columba palumbus</i>	682	448
hrdlička zahradní	<i>Streptopelia decaocto</i>	580	448
husa domácí	<i>Anser anser f. domesticus</i>	570	476
kachna divoká	<i>Anas platyrhynchos</i>	570	452
kachna domácí	<i>Anas platyrhynchos f. domestica</i>	570	452
kakadu růžový	<i>Eolophus roseicapilla</i>	640	454
krocán domácí	<i>Meleagris gallopavo f. domestica</i>	592	457
křepelka čínská	<i>Coturnix chinensis</i>	628	444
kur domácí	<i>Gallus gallus f. domesticus</i>	593	447
labuť velká	<i>Cygnus olor</i>	583	476
papoušek mniší	<i>Myiopsitta monachus</i>	687	451
racek šedokřídlý	<i>Larus glaucescens</i>	645	415
žako šedý	<i>Psittacus erithacus</i>	639	455

5.2.4 Porovnání sekvence ampliconu markeru 2550F – 2718R s databází NCBI

Pro porovnání získaných sekvencí, byly v rámci databáze NCBI použity sekvence takových druhů, které jsou taxonomicky zařazeny do stejných čeledí, jako druhy sekvenované při řešení bakalářské práce. Jednalo se o následující čeledi: *Phasianidae*, *Anatidae*, *Laridae*, *Columbiidae*, *Psittacidae* a *Corvidae*. Na obrázcích 22 a 23 jsou uvedeny výsledky porovnání sekvencí pomocí programu Bioedit.

Obrázek 22: Porovnání sekvence markeru 2550F – 2718R gonozómu Z s databází NCBI – 1. část



Obrázek 22: Porovnání sekvence markeru 2550F – 2718R gonozómu Z s databází NCBI – 2. část

	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Gallus gallus Z GU132943.1	GTA	CCCAAGAGG	CTT	GATCCT	GAACTTA	AAGAAAAAT	CATGTTTAT	ATTCTGAGGG	TGACA			TGGTGGAGT	GAGCTGT	ACAGATGTCGTGAAATCTCC
Gallus gallus f. domestica Z ČZU														
Coturnix chinensis Z ČZU														
Coturnix coturnix Z AY6288569.1														
Coturnix japonica Z HQ593873.1														
Syrnaticus reevesii Z GU132945.1														
Alectoris rufa Z AY628570.1														
Centrocercus urophasianus Z AF526006.1														
Phasianus colchicus Z AF526002.1														
Tetrao tetrix Z AF364552.1														
Meleagris gallopavo f. domestica Z ČZU														
Meleagris gallopavo Z AF526014.1														
Cygnus olor Z ČZU														
Cygnus buccinator Z AY178114.1														
Anser anser f. domesticus Z ČZU														
Anser cygnoides orientalis Z HQ423307.1														
Branta leucopsis Z AF525972.1														
Anas platyrhynchos Z ČZU														
Anas platyrhynchos f. domestica Z ČZU														
Anas penelope Z AY881812.1														
Anas clypeata Z AY881840.1														
Anas discors Z AY881839.1														
Anas americana Z AY881818.1														
Anas sibilatrix Z AY881815.1														
Dendrocygna viduata Z JF279561.1														
Aix sponsa Z AY881837.1														
Somateria mollissima Z AF525986														
Bucephala clangula Z AF525992.1														
Larus glaucescens Z ČZU	GTA	.G.	.A	CT	.T	.GTAC	.T	.T	.A	.T	.C	.T	.CT	.T
Larus ridibundus Z JF279565.1	GTA	.G.	.A	CT	.T	.GTGC	.T	.T	.A	.T	.C	.T	.CT	.T
Larus hyperboreus Z AF525988.1	GTA	.G.	.A	CT	.C	.T	.GTAC	.T	.T	.A	.T	.C	.T	.CT
Larus argentatus Z AF525994.1	GTA	.G.	.A	CT	.C	.T	.GTAC	.T	.T	.A	.T	.C	.T	.CT
Columba livia f. domestica Z ČZU	GTA	.G.	.A	CT	.C	.T	.TA	.T	.T	.C	.T	.C	.C	.G
Columba livia Z AY517719.1	GTA	.G.	.A	CT	.C	.T	.TA	.T	.T	.C	.T	.C	.C	.G
Columba palumbus Z ČZU	GTA	.G.	.A	CT	.C	.T	.TG	.T	.T	.C	.T	.C	.C	.G
Columba palumbus Z JF279562.1	GTA	.G.	.A	CT	.C	.T	.TG	.T	.T	.C	.T	.C	.C	.G
Streptopelia decaocto Z ČZU	GTA	.G.	.A	CT	.C	.T	.TA	.T	.T	.C	.T	.C	.C	.G
Ara ararauna Z ČZU	TTA	.G.	.A	CT	.T	.TA	T	.T	.T	.C	.T	.A	.G	.TA
Ara militaris Z DQ331021.1	TTA	.G.	.A	CT	.T	.TA	T	.T	.T	.C	.T	.A	.G	.TA
Myiopsitt monachus Z ČZU	TTA	.G.	.A	CT	.T	.TA	T	.T	.T	.C	.T	.A	.G	.TA
Psittacus erithacus erithacus Z ČZU	GCA	.G.	.A	CT	.T	.TA	T	.T	.T	.C	.T	.A	.G	.TA
Agapornis roseicollis Z ČZU	GTA	.G.	.A	CT	.T	.TA	T	.T	.T	.C	.T	.A	.G	.TA
Eolophus roseicapilla Z ČZU	GTA	.G.	.A	CT	.T	.TA	T	.T	.T	.C	.T	.A	.G	.TA
Melopsittacus undulatus Z ČZU	GTA	.G.	.A	CT	.T	.TA	T	.T	.T	.C	.T	.A	.G	.TA
Amazona oratrix Z DQ331023.1	TTA	.G.	.A	C	.T	.TA	T	.T	.T	.C	.T	.A	.G	.TA
Cyanoramphus novaezealandiae chathamensis Z AB247269.1	GTA	.G.	.A	CT	.T	.TA	T	.T	.T	.C	.TG	.A	.G	.GTA
Cyanoramphus forbesi Z AB247267.1	GTA	.G.	.A	CT	.T	.TA	T	.T	.T	.C	.TG	.A	.G	.GTA
Corvus frugilegus Z ČZU	AATA	.C	.G	.T	.A	.CT	.T	.T	.TA	.T	.AG	.T	.T	.C
Corvus frugilegus Z HM244402.1	AATA	.C	.G	.T	.A	.CT	.T	.T	.TA	.T	.AG	.T	.T	.C
Corvus corone corone Z AB246035.1	AATA	.C	.G	.T	.A	.CT	.T	.T	.TA	.T	.AG	.T	.T	.C
Corvus corax Z AF525982.1	AATA	.C	.G	.T	.A	.CT	.T	.T	.TA	.T	.AG	.T	.T	.C
Corvus macrorhynchos japonensis Z AB246034.1	AATA	.C	.G	.T	.A	.CT	.T	.T	.TA	.T	.AG	.T	.T	.C
Cyanocitta cristata Z HQ391560.1	AATA	.C	.G	.T	.A	.CT	.T	.T	.TA	.T	.AG	.T	.T	.C
Pica pica Z HQ391559.1	AATA	.C	.G	.T	.A	.CT	.T	.T	.TA	.T	.AG	.T	.T	.C
Perisoreus infaustus Z AF526010.1	AATA	.C	.G	.T	.A	.CT	.T	.T	.TA	.T	.AG	.T	.T	.C

Obrázek 22: Porovnání sekvence markeru 2550F – 2718R gonozómu Z s databází NCBI – 3. část

	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Gallus gallus Z GU132943.1	ATTCTCTGTGATACATAAAAGTCAACT	GGGCAC	TGTCCTGGTTAGC	CTGCTGTAGCAGACCTTGGTGGAAACAGG								ACAAGATGACCTCTA		
Gallus gallus f. domestica Z ČZUG.....													
Coturnix chinensis Z ČZUA.C.T.....C.....													
Coturnix coturnix Z AY628569.1C.....T.....C.A.....													
Coturnix japonica Z HQ593873.1C.....T.....C.A.....													
Syrnaticus reevesii Z GU132945.1T.....T.....C.....													
Alectoris rufa Z AY628570.1A.....T.....C.....													
Centrocercus urophasianus Z AF526006.1T.....T.....G.....G.....													
Phasianus colchicus Z AF526002.1T.....T.....C.....G.....													
Tetrao tetrix Z AF364552.1	G.....G.....T.....C.....G.....													
Meleagris gallopavo f. domestica Z ČZUC.....C.....C.....													
Meleagris gallopavo Z AF526014.1C.....C.....C.....													
Cygnus olor Z ČZUA.....T.....C.....G.....													
Cygnus buccinator Z AY178114.1	G.....CA.....AT.....C.....G.....													
Anser anser f. domestica Z ČZU	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Anser cygnoides orientalis Z HQ423307.1	G.....TG.CA.....AT.....C.....G.....													
Branta leucopsis Z AF525972.1	G.....G.CA.....AT.....C.....G.....													
Anas platyrhynchos Z ČZU	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Anas platyrhynchos f. domestica Z ČZU	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Anas penelope Z AY881812.1	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Anas clypeata Z AY881840.1	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Anas discors Z AY881839.1	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Anas americana Z AY881818.1	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Anas sibilatrix Z AY881815.1	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Dendrocygna viduata Z JF279561.1	G.....CA.....AT.....C.....G.....													
Aix sponsa Z AY881837.1	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Somateria mollissima Z AF525986	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Bucephala clangula Z AF525992.1	G.....CA.....AT.....AG.GG.....													
Larus glaucescens Z ČZU	G.....A.....C.TTC.....C.GC.G.....													
Larus ridibundus Z JF279565.1	G.....A.....C.TTC.....C.GC.G.....													
Larus hyperboreus Z AF525988.1	G.....A.....G.....C.TTC.....C.GC.G.....													
Larus argentatus Z AF525994.1	G.....A.....G.....C.TTC.....C.GC.G.....													
Columba livia f. domestica Z ČZU	C.....C.....T.....C.TTC.....C.C.....													
Columba livia Z AY517719.1	C.....C.....T.....C.TTC.....C.C.....													
Columba palumbus Z ČZU	C.....C.....T.....C.TTC.....C.C.....													
Columba palumbus Z JF279562.1	C.....C.....T.....C.TTC.....C.C.....													
Streptopelia decaocto Z ČZU	C.....C.....CT.....C.TTC.....C.C.....													
Ara ararauna Z ČZU	G.....G.AC.....TC.G.....C.C.....													
Ara militaris Z DQ331021.1	G.....G.AC.....TC.G.....C.C.....													
Myiopsitt monachus Z ČZU	G.....G.AC.....TC.G.....C.C.....													
Psittacus erithacus erithacus Z ČZU	G.....G.AC.....TTC.G.....C.C.....													
Agapornis roseicollis Z ČZU	G.....G.AC.....TC.G.....C.C.....													
Eolophus roseicapilla Z ČZU	G.....G.AC.....TC.G.....C.C.....													
Melopsittacus undulatus Z ČZU	G.....G.AC.....TC.G.....C.C.....													
Amazona oratrix Z DQ331023.1	GC.....G.AC.....TC.G.....C.C.....													
Cyanoramphus novaezelandiae chathamensis Z AB247269.1	G.....G.AC.....TC.G.....C.C.....													
Cyanoramphus forbesi Z AB247267.1	G.....G.AC.....TC.G.....C.C.....													
Corvus frugilegus Z ČZU	TC.....TGTG.....GGTCC.....CT.C.....													
Corvus frugilegus Z HM244402.1	TC.....TGTG.....GGTCC.....CT.C.....													
Corvus corone corone Z AB246035.1	TC.....TGTG.....GGTCC.....CT.C.....													
Corvus corax Z AF525982.1	TC.....TGTG.....GGTCC.....CT.C.....													
Corvus macrorhynchos japonensis Z AB246034.1	TC.....TGTG.....GGTCC.....CT.C.....													
Cyanocitta cristata Z HQ391560.1	TC.....TGTG.....GGTCC.....CT.C.....													
Pica pica Z HQ391559.1	TC.....TGTG.....GGTCC.....CT.C.....													
Perisoreus infaustus Z AF526010.1	TC.....TGTG.....GGTCC.....CT.C.....													

Obrázek 22: Porovnání sekvence markeru 2550F – 2718R gonozómu Z s databází NCBI – 4. část

	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
Gallus gallus Z GU132943.1	GAG		GTGCTTCCAGTATTTCAACCACTCTGTGATTATTGATCTTCACCACTTTTGCCTTAAAGA	AAAGAAA					GCAACTTTCA					GT
Gallus gallus f. domestica Z ČZU														
Coturnix chinensis Z ČZU														
Coturnix coturnix Z AY628569.1														
Coturnix japonica Z HQ593873.1														
Syrnaticus reevesii Z GU132945.1														
Alectoris rufa Z AY628570.1														
Centrocercus urophasianus Z AF526006.1														
Phasianus colchicus Z AF526002.1														
Tetrao tetrix Z AF364552.1														
Meleagris gallopavo f. domestica Z ČZU														
Meleagris gallopavo Z AF526014.1														
Cygnus olor Z ČZU														
Cygnus buccinator Z AY178114.1														
Anser anser f. domesticus Z ČZU														
Anser cygnoides orientalis Z HQ423307.1														
Branta leucopsis Z AF525972.1														
Anas platyrhynchos Z ČZU														
Anas platyrhynchos f. domestica Z ČZU														
Anas penelope Z AY881812.1														
Anas clypeata Z AY881840.1														
Anas discors Z AY881839.1														
Anas americana Z AY881818.1														
Anas sibilatrix Z AY881815.1														
Dendrocygna viduata Z JF279561.1														
Aix sponsa Z AY881837.1														
Somateria mollissima Z AF525986														
Bucephala clangula Z AF525992.1														
Larus glaucescens Z ČZU														
Larus ridibundus Z JF279565.1														
Larus hyperboreus Z AF525988.1														
Larus argentatus Z AF525994.1														
Columba livia f. domestica Z ČZU														
Columba livia Z AY517719.1														
Columba palumbus Z ČZU														
Columba palumbus Z JF279562.1														
Streptopelia decaocto Z ČZU														
Ara ararauna Z ČZU														
Ara militaris Z DQ331021.1														
Myiopsitt monachus Z ČZU														
Psittacus erithacus erithacus Z ČZU														
Agapornis roseicollis Z ČZU														
Eolophus roseicapilla Z ČZU														
Melopsittacus undulatus Z ČZU														
Amazona oratrix Z DQ331023.1														
Cyanoramphus novaezelandiae chathamensis Z AB247269.1														
Cyanoramphus forbesi Z AB247267.1														
Corvus frugilegus Z ČZU														
Corvus frugilegus Z HM244402.1														
Corvus corone corone Z AB246035.1														
Corvus corax Z AF525982.1														
Corvus macrorhynchos japonensis Z AB246034.1														
Cyanocitta cristata Z HQ391560.1														
Pica pica Z HQ391559.1														
Perisoreus infaustus Z AF526010.1														

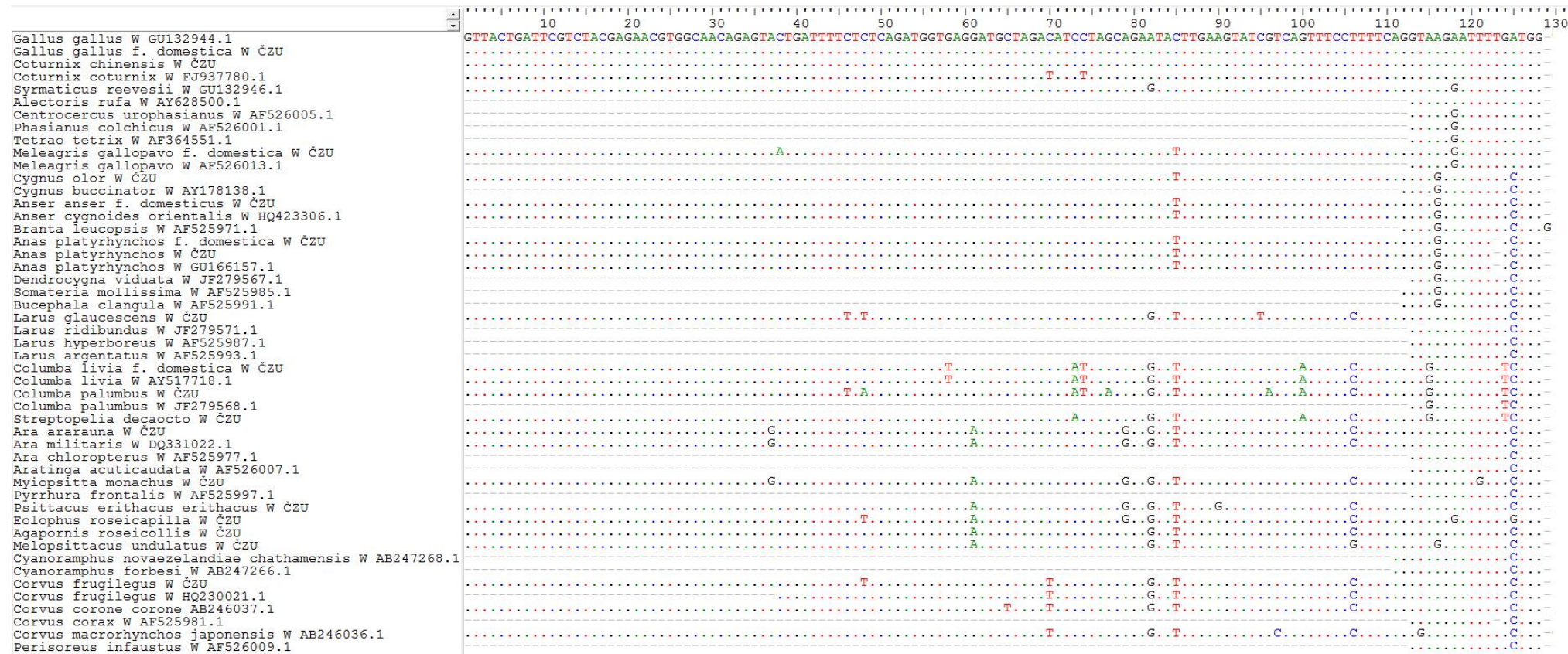
Obrázek 22: Porovnání sekvence markeru 2550F – 2718R gonozómu Z s databází NCBI – 5. část

	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
Gallus gallus Z GU132943.1	TAAAAAG	ATTATGTGAACAAATATGTTAAC			AT			TCCTTCCTTTTGTCCCTCACATTGCTGTTTTATCAGTTAAAAAGT						
Gallus gallus f. domestica Z ČZU														
Coturnix chinensis Z ČZU	.G
Coturnix coturnix Z AY628569.1	
Coturnix japonica Z HQ593873.1	
Syrnaticus reevesii Z GU132945.1	CTG
Alectoris rufa Z AY628570.1	A
Centrocercus urophasianus Z AF526006.1	.TC
Phasianus colchicus Z AF526002.1	CT
Tetrao tetrix Z AF364552.1	.C
Meleagris gallopavo f. domestica Z ČZU	.T
Meleagris gallopavo Z AF526014.1	.T
Cygnus olor Z ČZU
Cygnus buccinator Z AY178114.1
Anser anser f. domestica Z ČZU
Anser cygnoides orientalis Z HQ423307.1
Branta leucopsis Z AF525972.1
Anas platyrhynchos Z ČZU
Anas platyrhynchos f. domestica Z ČZU
Anas penelope Z AY881812.1
Anas clypeata Z AY881840.1
Anas discors Z AY881839.1
Anas americana Z AY881818.1
Anas sibilatrix Z AY881815.1
Dendrocygna viduata Z JF279561.1
Aix sponsa Z AY881837.1
Somateria mollissima Z AF525986
Bucephala clangula Z AF525992.1
Larus glaucescens Z ČZU
Larus ridibundus Z JF279565.1
Larus hyperboreus Z AF525988.1
Larus argentatus Z AF525994.1
Columba livia f. domestica Z ČZU
Columba livia Z AY517719.1
Columba palumbus Z ČZU
Columba palumbus Z JF279562.1
Streptopelia decaocto Z ČZU
Ara ararauna Z ČZU
Ara militararis Z DQ331021.1
Myiopsitt monachus Z ČZU
Psittacus erithacus erithacus Z ČZU
Agapornis roseicollis Z ČZU
Eolophus roseicapilla Z ČZU
Melopsittacus undulatus Z ČZU
Amazona oratrix Z DQ331023.1
Cyanoramphus novaeseelandiae chathamensis Z AB247269.1
Cyanoramphus forbesi Z AB247267.1
Corvus frugilegus Z ČZU
Corvus frugilegus Z HM244402.1
Corvus corone corone Z AB246035.1
Corvus corax Z AF525982.1
Corvus macrorhynchos japonensis Z AB246034.1
Cyanocitta cristata Z HQ391560.1
Pica pica Z HQ391559.1
Perisoreus infaustus Z AF526010.1

Obrázek 22: Porovnání sekvence markeru 2550F – 2718R gonozómu Z s databází NCBI – 6. část

	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
Gallus gallus Z GU132943.1	CAAGTTACTGTGATG	GGAATATAGCTAAAGAATTACTTTTAGACTGTAG	TTTTTC	AATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGAGCAAGCACTGGATCATTCAAT										
Gallus gallus f. domestica Z ČZU	T	G	A	A			G							
Coturnix chinensis Z ČZU	ACTGGTTC	G	A	G			A					C		A
Coturnix coturnix Z AY628569.1	ACTGGTTC	G	A	G			A					C		A
Coturnix japonica Z HQ593873.1														
Syrnaticus reevesii Z GU132945.1														
Alectoris rufa Z AY628570.1														
Centrocercus urophasianus Z AF526006.1														
Phasianus colchicus Z AF526002.1														
Tetrao tetrix Z AF364552.1														
Meleagris gallopavo f. domestica Z ČZU														
Meleagris gallopavo Z AF526014.1														
Cygnus olor Z ČZU														
Cygnus buccinator Z AY178114.1	GTGC	A	A	T	GT	T	GTG	TGA	AGGG	T	G	AA	C	C
Anser anser f. domestica Z ČZU														
Anser cygnoides orientalis Z HQ423307.1														
Branta leucopsis Z AF525972.1														
Anas platyrhynchos Z ČZU														
Anas platyrhynchos f. domestica Z ČZU														
Anas penelope Z AY881812.1														
Anas clypeata Z AY881840.1														
Anas discors Z AY881839.1														
Anas americana Z AY881818.1														
Anas sibilatrix Z AY881815.1														
Dendrocygna viduata Z JF279561.1														
Aix sponsa Z AY881837.1														
Somateria mollissima Z AF525986														
Bucephala clangula Z AF525992.1														
Larus glaucescens Z ČZU														
Larus ridibundus Z JF279565.1														
Larus hyperboreus Z AF525988.1														
Larus argentatus Z AF525994.1														
Columba livia f. domestica Z ČZU	GATTTT	G	A	T	G	A	A	T	G	A	A	T	T	G
Columba livia Z AY517719.1	GATTTT	G	A	T	G	A	A	T	G	A	A	T	T	G
Columba palumbus Z ČZU	GATTTT	G	A	T	G	A	A	T	G	A	A	T	T	G
Columba palumbus Z JF279562.1	GATTTT	G	A	T	G	A	A	T	G	A	A	T	T	G
Streptopelia decaocto Z ČZU	GATTTT	G	A	T	G	A	A	T	G	A	A	T	T	G
Ara ararauna Z ČZU	TGG	G	G	C	TTT									
Ara militaris Z DQ331021.1	TGG	G	G	C	TTT									
Myiopsitt monachus Z ČZU	TGG	G	G	C	TTT									
Psittacus erithacus erithacus Z ČZU	TGG	G	G	C	TTT									
Agapornis roseicollis Z ČZU	TGG	G	G	C	TTT									
Eolophus roseicapilla Z ČZU	TGG	G	G	C	TTT									
Melopsittacus undulatus Z ČZU	TGG	G	G	C	TTT									
Amazona oratrix Z DQ331023.1	TGG	G	G	C	TTT									
Cyanoramphus novaezelandiae chathamensis Z AB247269.1	TGG	G	G	T	TTT	CG	TAT							
Cyanoramphus forbesi Z AB247267.1	TGG	G	G	T	TTT	CG	TAT							
Corvus frugilegus Z ČZU	G													
Corvus frugilegus Z HM244402.1	G													
Corvus corone corone Z AB246035.1	G													
Corvus corax Z AF525982.1	G													
Corvus macrorhynchos japonensis Z AB246034.1	A													
Cyanocitta cristata Z HQ391560.1	G													
Pica pica Z HQ391559.1	G													
Perisoreus infaustus Z AF526010.1	G													

Obrázek 23: Porovnání sekvence markeru 2550F – 2718R gonozómu W s databází NCBI – 1. část



Obrázek 23: Porovnání sekvence markeru 2550F – 2718R gonozómu W s databází NCBI – 3. část

	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Gallus gallus W GU132944.1	GGTGTGAGG	TGTTGCAT	TATTC	TCCCTCCCTCCCT	TCCCTCCCTCCCT	TCCCTCCCTCCCT	TCCCTCCCTCCCT	TCCCTCCCTCCCT	TCCCTCCCTCCCT	AGTTGTTTGGCAAT	TGAGTAT	TCAGGTTGCTCTGATTA		
Gallus gallus f. domestica W ČZU	GGTGTGAGG	TGTTGCAT	TATTC	TCCCTCCCTCCCT	TCCCTCCCTCCCT	TCCCTCCCTCCCT	TCCCTCCCTCCCT	TCCCTCCCTCCCT	TCCCTCCCTCCCT	AGTTGTTTGGCAAT	TGAGTAT	TCAGGTTGCTCTGATTA		
Coturnix chinensis W ČZU	CA.A			G	T.C					A	T	C.T		C
Coturnix coturnix W FJ937780.1	CA				T					A	C	T		A.C
Syrnaticus reevesii W GU132946.1	A	G			T					A	C	C	GCAT	C
Alectoris rufa W AY628500.1					T			G		A	G			G
Centrocercus urophasianus W AF526005.1	A						AT			A	C	C.A	GCAT	
Phasianus colchicus W AF526001.1	A						T			A	C	C	GTAT	
Tetrao tetrix W AF364551.1	A						AT			A	C	C.A	GCAT	
Meleagris gallopavo f. domestica W ČZU	A	AA				CCTC	CTT			A	C	C	GCAT	
Meleagris gallopavo W AF526013.1	A	AA				CCTC	CTT			A	C	C	GCAT	
Cygnus olor W ČZU	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAC	.A.AA	.GAAAGG	GG.GTAAAATGTT	ACA.TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A		.AT	.A
Cygnus buccinator W AY178138.1	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAC	.A.AA	.GAAAGG	GG.GTAAAATGTT	ACA.TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A		.AT	.A
Anser anser f. domestica W ČZU	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAC	.A.AA	.GAAAGG	GG.GTAAAATGTT	ACA.TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A		.AT	.A
Anser cygnoides orientalis W HQ423306.1	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAC	.A.AA	.GAAAGG	GG.GTAAAATGTT	ACA.TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A		.AT	.A
Branta leucopsis W AF525971.1	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAC	.A.AA	.GAAAGG	GG.GTAAAATGTT	ACA.TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A		.AT	.A
Anas platyrhynchos f. domestica W ČZU	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAA	.A.AA	.GAAAGG	G	TT.ACA	TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A	.AT	.A
Anas platyrhynchos W ČZU	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAA	.A.AA	.GAAAGG	G	TT.ACA	TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A	.AT	.A
Anas platyrhynchos W GU166157.1	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAA	.A.AA	.GAAAGG	G	TT.ACA	TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A	.AT	.A
Dendrocygna viduata W JF279567.1	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAC	.A.AA	.GAAAGG	GG.GTAAAATGTT	ACA.TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A		.AT	.AA
Somateria mollissima W AF525985.1	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAC	.A.AA	.GAAAGG	GG.GTAAAATGTT	ACA.TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A		.AT	.A
Bucephala clangula W AF525991.1	AAATGGTGT	TTT.AAA	.AAC	.A.AA	.GAAAGG	GG.GTAAAATGTT	ACA.TA	T.TTC	C.T.G	.TA	A		.AT	.A
Larus glaucescens W ČZU		C.A	TA		GAAAGA	T	AAAGTGT	ACC	TA	TT	CCC	C	A	
Larus ridibundus W JF279571.1		C.A	TA		GAAAGA	T	AAAGTGT	ACC	TA	TT	CCC	C	A	
Larus hyperboreus W AF525987.1		C.A	TA		GAAAGA	T	AAAGTGT	ACC	TA	TT	CCC	C	A	
Larus argentatus W AF525993.1		C.A	TA		GAAAGA	T	AAAGTGT	ACC	TA	TT	CCC	C	A	
Columba livia f. domestica W ČZU	AAATAGTAT	TTTT.AA	.T.AAC	.A.A	.GAAAGA	G	AAAGTGT	TACA	TA	TTTT		A	ACC	
Columba livia W AY517718.1	AAATAGTAT	TTTT.AA	.T.AAC	.A.A	.GAAAGA	G	AAAGTGT	TACA	TA	TTTT		A	ACC	
Columba palumbus W ČZU	AAATAGTAT	TTTT.AA	.T.AAC	.A.A	.GAAAGA	G	AAAGTGT	TACA	TA	TTTT		A	ACC	
Columba palumbus W JF279568.1	AAATAGTAT	TTTT.AA	.T.AAC	.A.A	.GAAAGA	G	AAAGTGT	TACA	TA	TTTT		A	ACC	
Streptopelia decaocto W ČZU	AAATAGTAT	TTTT.AA	.T.AAC	.A.A	.GAAAGA	G	AAAGTGT	TACA	TA	TTTT		A	ACC	T
Ara ararauna W ČZU	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.A	.GAAAGAC		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Ara militaris W DQ331022.1	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.A	.GAAAGAC		CGTT.ACA	TT	T.TT	A				
Ara chloropterus W AF525977.1	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.A	.GAAAGAC		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Aratinga acuticaudata W AF526007.1	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.A	.GAAAGAC		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Myiopsitta monachus W ČZU	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.A	.GAAAGA		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Pyrrhura frontalis W AF525997.1	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAM	.A.A	.GAAAGAC		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Psittacus erithacus erithacus W ČZU	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.A	.CAGAGA		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Eolophus roseicapilla W ČZU	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.A	.GAAAGA		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Agapornis roseicollis W ČZU	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.A	.GAAAGA		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Melopsittacus undulatus W ČZU	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.AT	.GAAAGG		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Cyanoramphus novaezelandiae chathamensis W AB247268.1	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.TA	.GAAAGA		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Cyanoramphus forbesi W AB247266.1	AAATAGTAT	TTTT.AAACA	.AAC	.A.TA	.GAAAGA		TGTT.ACA	TT	T.TT	C	C			
Corvus frugilegus W ČZU	TAATAGTAT	TTTT.AAA	.T.AAC	.A.TA	.GGAAG		TGTT.ACA	TA	TT					
Corvus frugilegus W HQ230021.1	TAATAGTAT	TTTT.AAA	.T.AAC	.A.TA	.GGAAG		TGTT.ACA	TA	TT					
Corvus corone corone AB246037.1	TAATAGTAT	TTTT.AAA	.T.AAC	.A.TA	.GGAAG		TGTT.ACA	TA	TT					
Corvus corax W AF525981.1	TAATAGTAT	TTTT.AAA	.T.AAC	.A.TA	.GGAAG		TGTT.ACA	TA	TT					
Corvus macrorhynchos japonensis W AB246036.1	TAATAGTAT	TTTT.AAA	.T.AAC	.A.TA	.GGAAG		TGTT.ACA	TA	TT					
Perisoreus infaustus W AF526009.1	AAATAGTAT	TTTT.AGA	.AAC	.A.A	.GAAAAA	G	AAAGTGT	AGG	TA	T	TT		T	CA

Obrazek 23: Porovnání sekvence markeru 2550F – 2718R gonozómu W s databází NCBI – 4. část

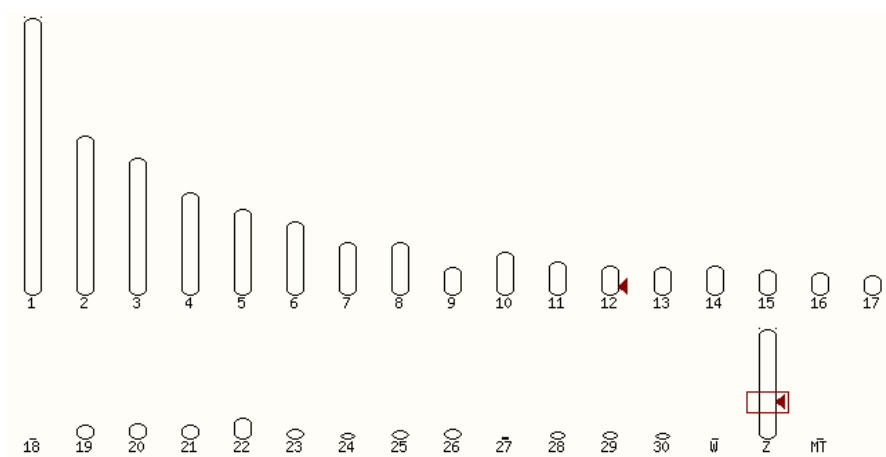


5.2.5 Porovnání sekvence ampliconu markeru 2550F – 2718R s databází Ensembl

V databázi Ensembl jsou uloženy sekvence genomů, zejména modelových genetických organismů. U ptáků je v této databázi velice podrobně zpracována sekvence genomu kura domácího a krocana domácího. V následující části bakalářské práce jsou uvedeny porovnání sekvence markeru 2550F – 2718R, lokalizovaného na Z gonozómu u krocana domácího.

Prvním výstupem srovnávací analýzy je identifikace polohy ampliconu v karyotypu hodnoceného zoologického druhu. Výstup analýzy prezentuje následující obrázek, ze kterého je patrné, že získaný amplicon vykazuje nejvyšší stupeň sekvenční podobnosti s oblastí gonozómu Z. Na obrázku 24 jsou uvedeny podobnosti porovnávaného ampliconu se sekvencí gonozómu Z.

Obrázek 24: Haploidní karyotyp krocana domácího s vyznačením místa maximální sekvenční podobnosti porovnávaného ampliconu – výstup programu Esembl



Obrázek 25: Porovnání sekvenční podobnosti ampliconu – výstup programu Esembl

Subject	Chromosome	Scaffold	Contig	Stats	SortBy						
off	_off_	_off_	_off_	_off_	>Contig						
Name	Name	Name	Name	Score	<Score						
Start	Start	Start	Start	E-val	>Score						
Links	Query	Query	Chromosome	Stats							
	Start	End	Name	Score	E-val						
			Start	E-val	%ID						
			End		Length						
[A] [G] [C]	3	592	+	ChrZ	53987997	53988586	+	2918	0.0e+00	99.66	590
[A] [G] [C]	1	116	+	ChrZ	53990291	53990406	+	517	3.8e-83	93.10	116
[A] [G] [C]	513	592	+	ChrZ	53990668	53990747	+	345	1.4e-52	91.25	80
[A] [G] [C]	26	73	+	Chr12	14623619	14623666	+	221	1.3e-30	93.75	48

Dalším krokem srovnávací analýzy je detailní vyhodnocení nukleotidových podobností. Výstup tohoto hodnocení je uveden na následujícím obrázku. Termínem Query je v této analýze označována námi získaná sekvence a termínem Sbjct je označená sekvence uvedená v databázi. Absencí svíslé čárky jsou na tomto obrázku vyznačeny nukleotidy, u kterých nebyla zjištěna sekvenční shoda.

Obrázek 26: Porovnání sekvenční podobnosti PCR ampliconu Z gonozómu krocana domácího s databází Ensembl

```

Query location      : Meleagris_gallopavo_f._domestica_Z_ČZU          3 to      592 (+)
Database location   : Z                                           53987997 to 53988586 (+)
Genomic location    : Z                                           53987997 to 53988586 (+)

Alignment score     : 2918
E-value             : 0.0e+00
Alignment length    : 590
Percentage identity: 99.66
Query:              3 tactgattcgtctacgagaacgtggcaacagagttctgattttctctcagatggtgagga 62
                   |||
Sbjct: 53987997 tactgattcggctgcgagaacgtggcaacagagttctgattttctctcagatggtgagga 53988056

Query:              63 tgctggacatcctagcagaatatctaaagtaccggcagtttcccttcaggtaatgatct 122
                   |||
Sbjct: 53988057 tgctggacatcctagcagaatatctaaagtaccggcagtttcccttcaggtaatgatct 53988116

Query:              123 tggttaaccaagaggtcttcatcctgaacttaagaaaaatcatgtttttactctgagggt 182
                   |||
Sbjct: 53988117 tggttaaccaagaggtcttcatcctgaacttaagaaaaatcatgtttttactctgagggt 53988176

Query:              183 ggacgagcagtgagtagtgtgttcagatgttgtaaatatccattctctgtgataccta 242
                   |||
Sbjct: 53988177 ggacgagcagtgagtagtgtgttcagatgttgtaaatatccattctctgtgataccta 53988236

Query:              243 aaagccaactggcggtggtcttgggaagcttgctgtagcaggccttggttgagcagacaa 302
                   |||
Sbjct: 53988237 aaagccaactggcggtggtcttgggaagcttgctgtagcaggccttggttgagcagacaa 53988296

Query:              303 gatgacttttagaggtccttccagatattcagccatctgtgattatctgttctttacat 362
                   |||
Sbjct: 53988297 gatgacttttagaggtccttccagatattcagccatctgtgattatctgttctttacat 53988356

Query:              363 tttgtttaagaaaagaagcaaccttgaatttaaaagattttgtgaaggagcatgttaac 422
                   |||
Sbjct: 53988357 tttgtttaagaaaagaagcaaccttgaatttaaaagattttgtgaaggagcatgttaac 53988416

Query:              423 atttcttcttttggttccttcacattgttgttttatcagttgaaagtcaggttactatg 482
                   |||
Sbjct: 53988417 atttcttcttttggttccttcacattgttgttttatcagttgaaagtcaggttactatg 53988476

Query:              483 atgggaatacagctaaagaattactttcagactgtagttttcaatctctttagagacttg 542
                   |||
Sbjct: 53988477 atgggaatacagctaaagaattactttcagactgtagttttcaatctctttagagacttg 53988536

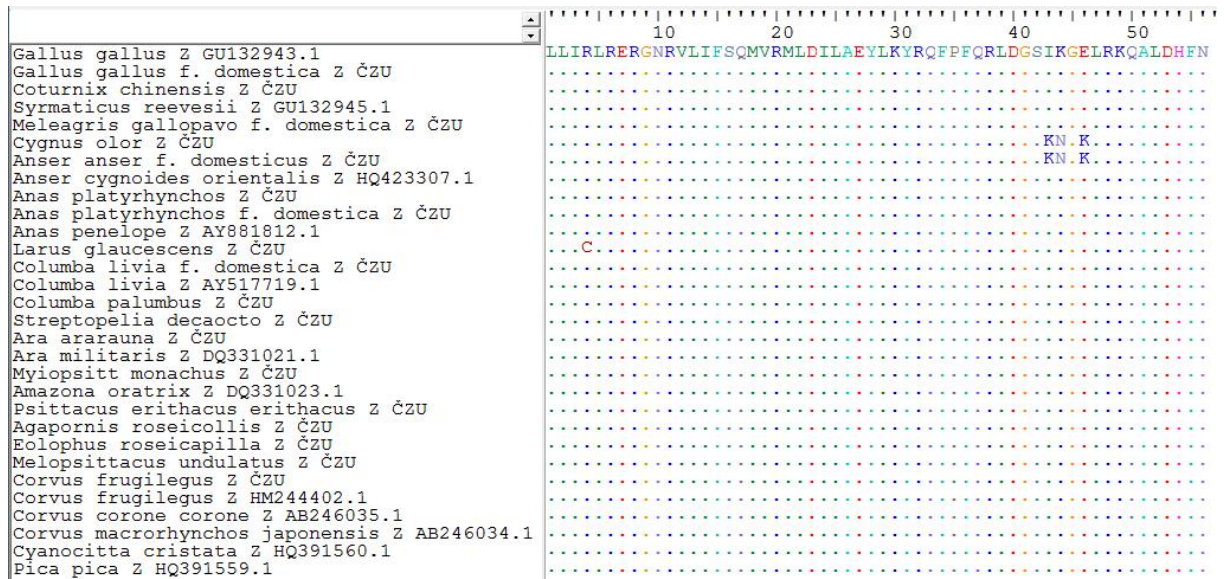
Query:              543 atggatcaataaaaggggaattgagaagcaagcactggatcatattcaat 592
                   |||
Sbjct: 53988537 atggatcaataaaaggggaattgagaagcaagcactggatcatattcaat 53988586

```

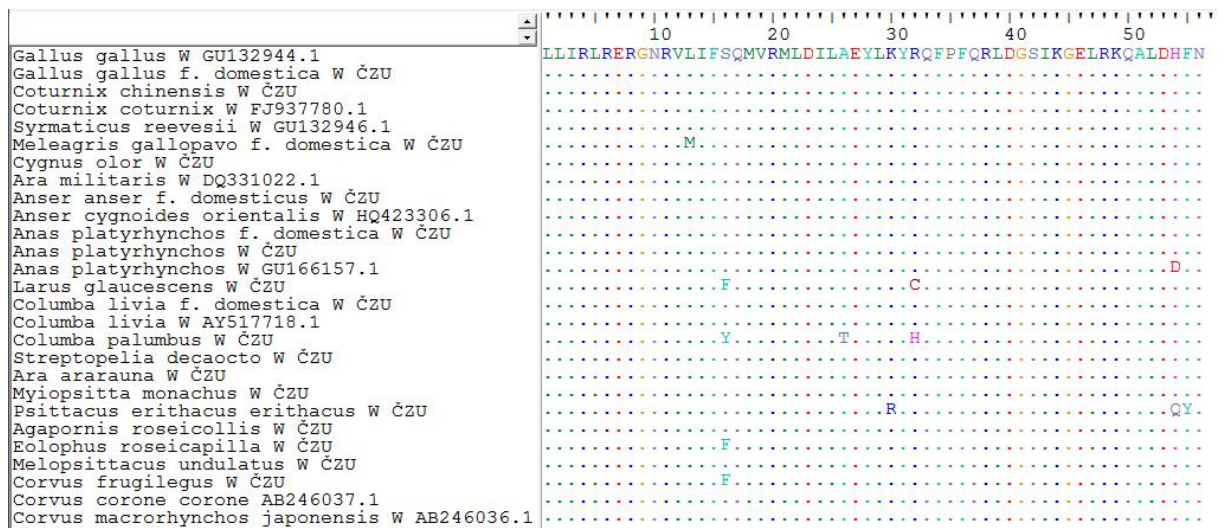

5.2.6 Predikce aminokyselinového složení částečné CDS stanovené na základě sekvenace markeru 2550F – 2718R

Na obrázcích 27 a 28 jsou uvedeny sekvence predikovaných polypeptidů stanovených na základě částečných CDS markeru 2550F – 2718R genu CHD1.

Obrázek 27: Predikované aminokyselinové složení polypeptidu markeru 2550F – 2718R lokalizovaného na gonozómu Z



Obrázek 28: Predikované aminokyselinové složení polypeptidu markeru 2550F – 2718R lokalizovaného na gonozómu W



Tečky na předchozích obrazech, představují stejnou aminokyselinu, jako je u prvního hodnoceného genotypu.

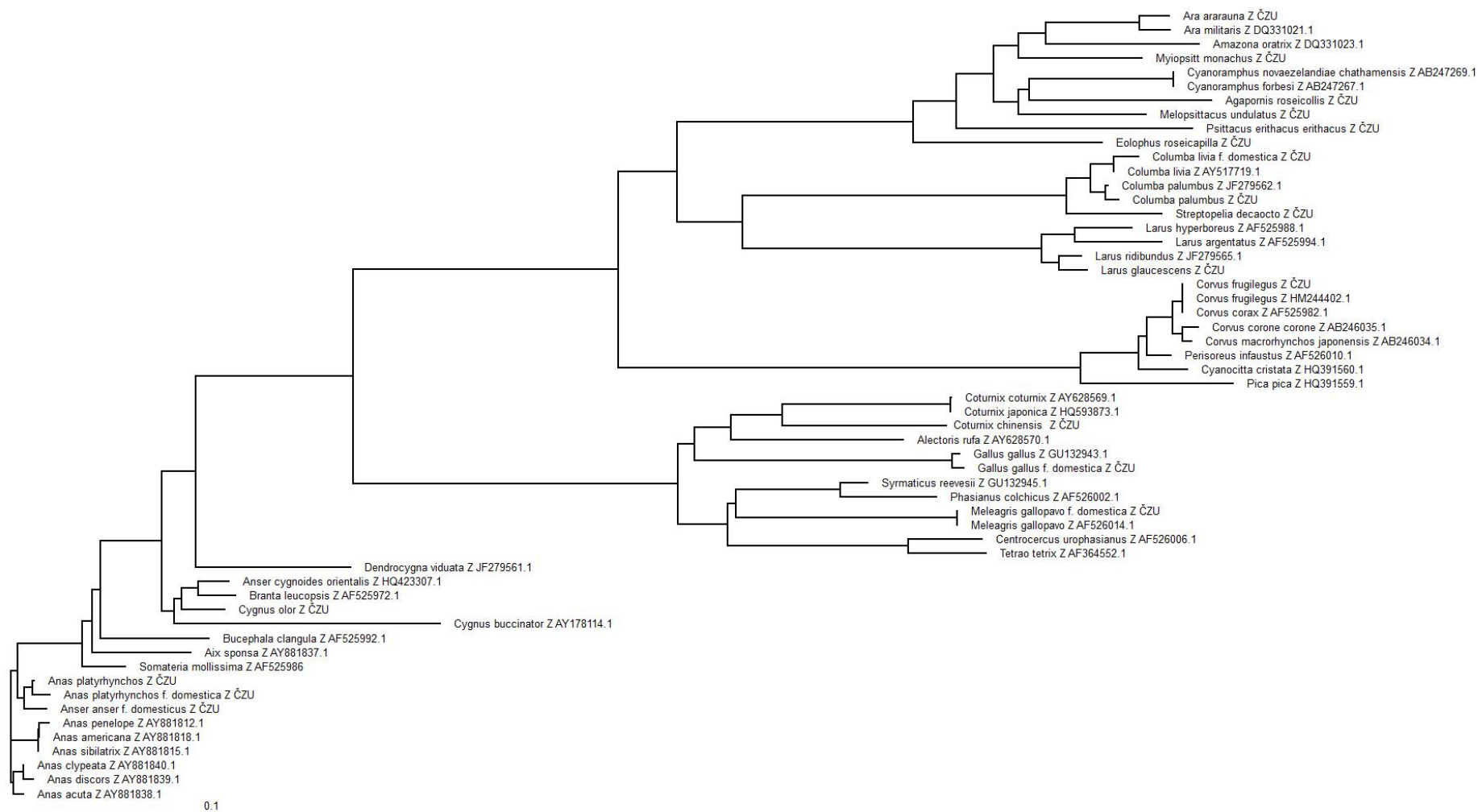
5.2.7 Konstrukce fylogramu na základě informací vyplývajících ze sekvenací markeru 2550F – 2718R

Z předchozích kapitol vyplývá, že bylo získáno několik skupin vzájemně porovnatelných sekvencí. Tyto skupiny sekvencí je možné rozdělit následujícím způsobem:

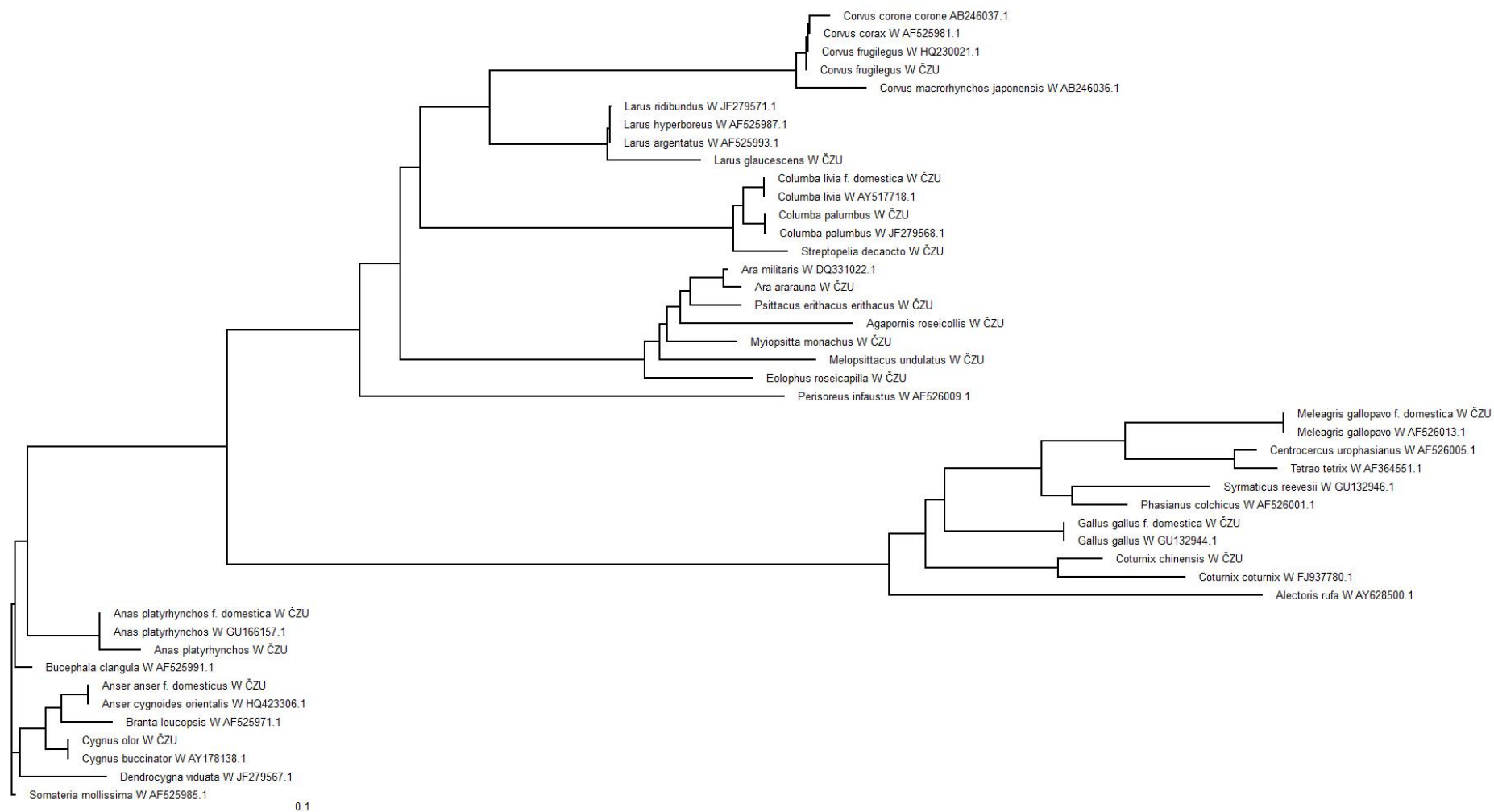
- fylogramy stanovené na základě sekvencí amplifikovaného intronu genu CHD1 gonozómu Z a W – obrázky 29, 30 a 31
- fylogramy stanovené na základě sekvencí celého amplikonu genu CHD1 vymezeného primery 2550F – 2718R gonozómu Z a W – obrázky 32, 33 a 34
- fylogramy stanovené na základě sekvencí částečných CDS gonozómů Z a W – obrázky 35, 36 a 37
- fylogramy stanovené na základě predikovaných aminokyselinových sekvencí, podle CDS gonozómů Z a W – obrázky 38, 39 a 40.

Další částí této kapitoly jsou uvedeny sestavené fylogramy, které jsou výstupem programu ClustalX a TreeView.

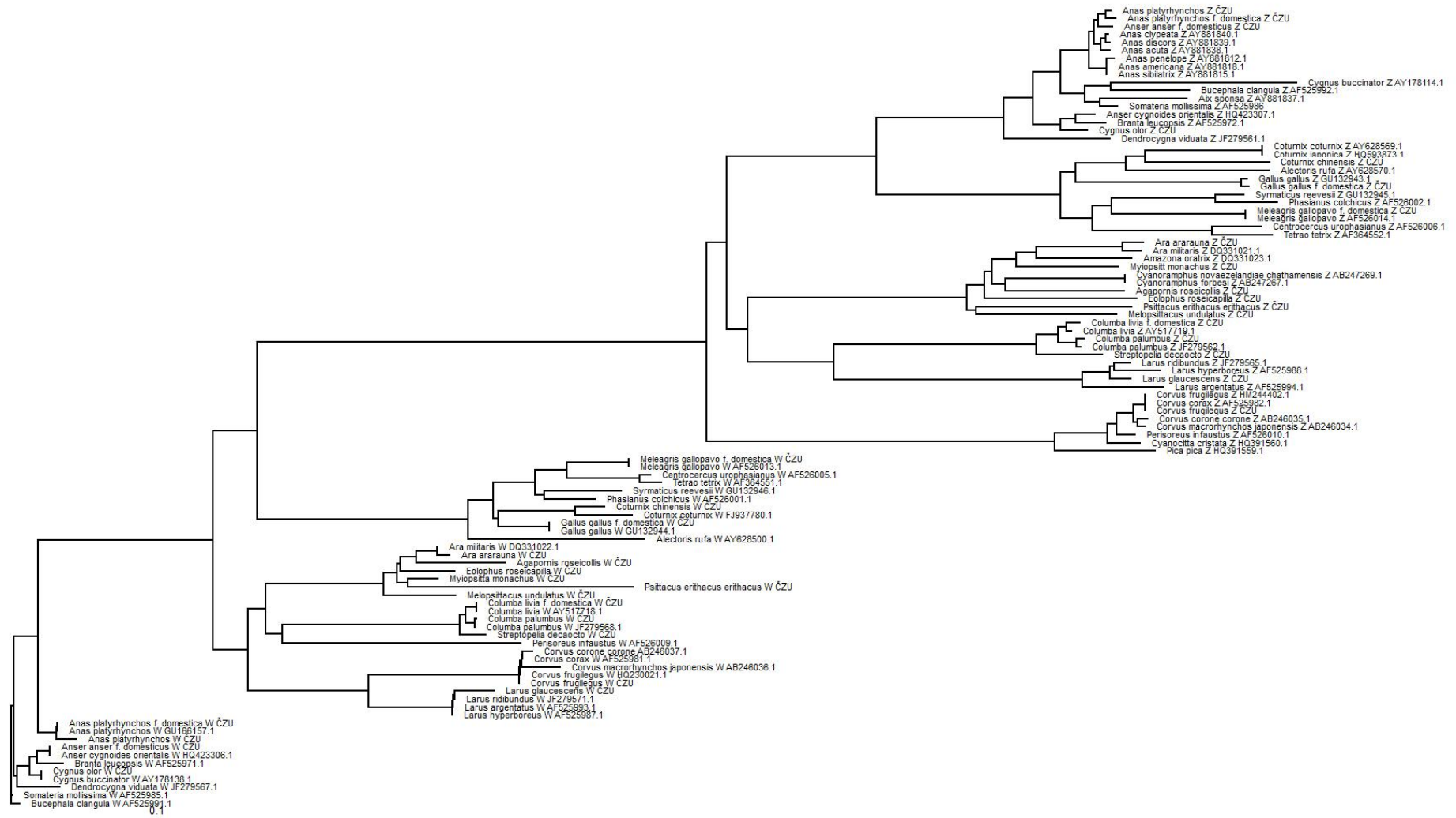
Obrázek 29: Fylogram sestavený na základě porovnání sekvencí amplifikovaného intronu genu CH1D u gonozómu Z



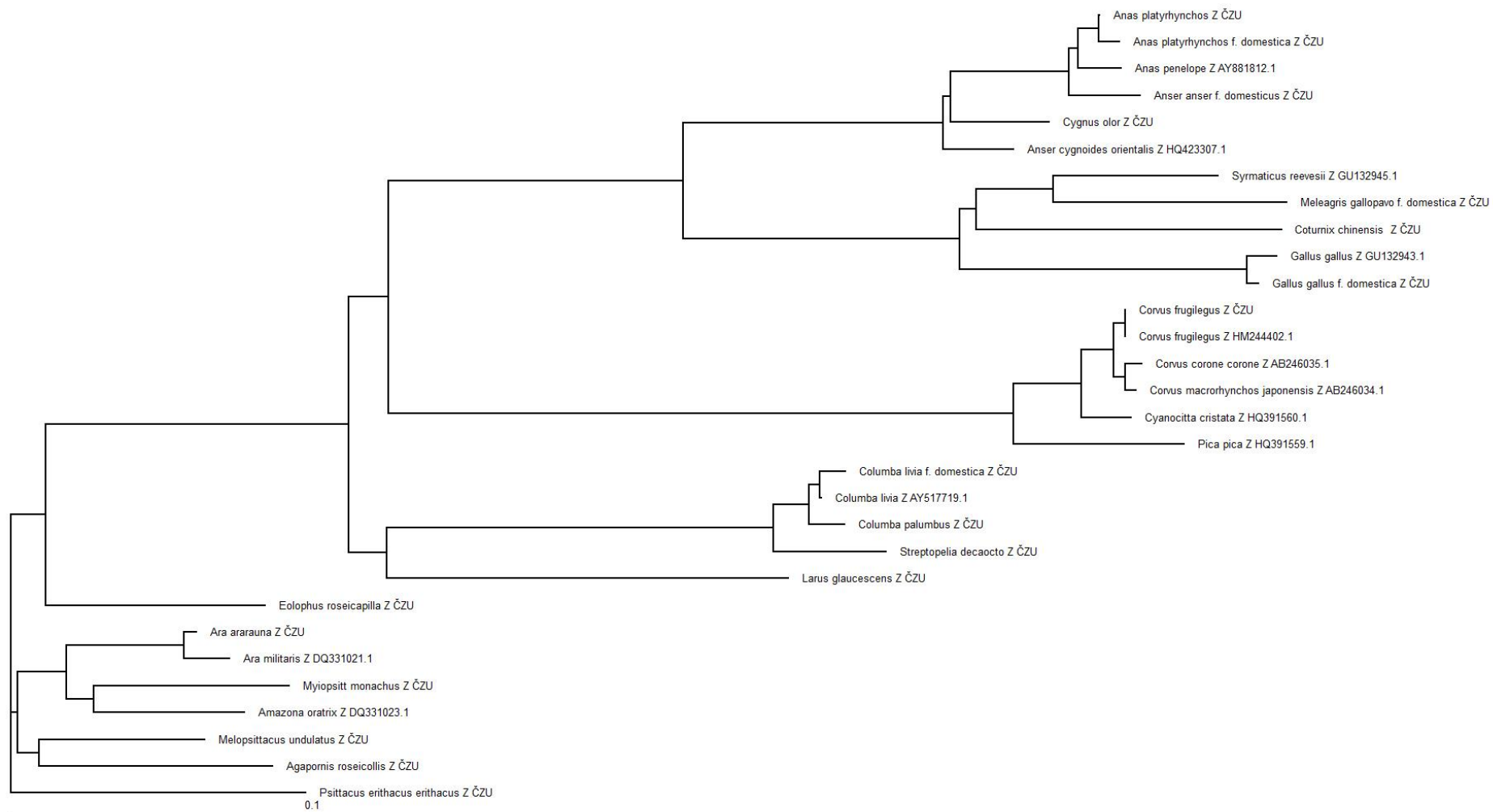
Obrázek 30: Fylogram sestavený na základě porovnání sekvencí amplifikovaného intronu genu CH1D u gonozómu W



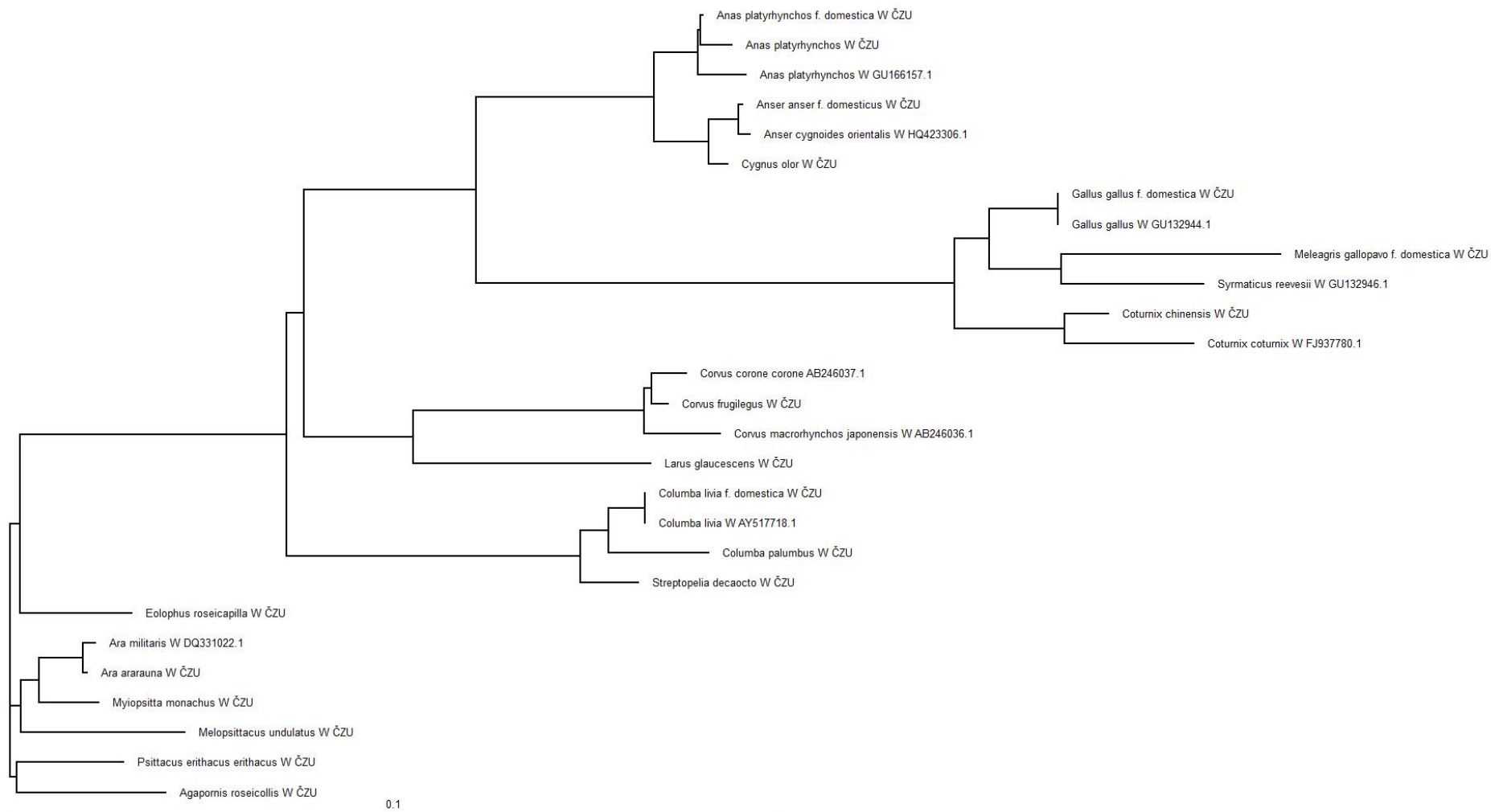
Obrázek 31: Fylogram sestavený na základě porovnání sekvencí amplifikovaného intronu genu CH1D u gonozómů Z a W



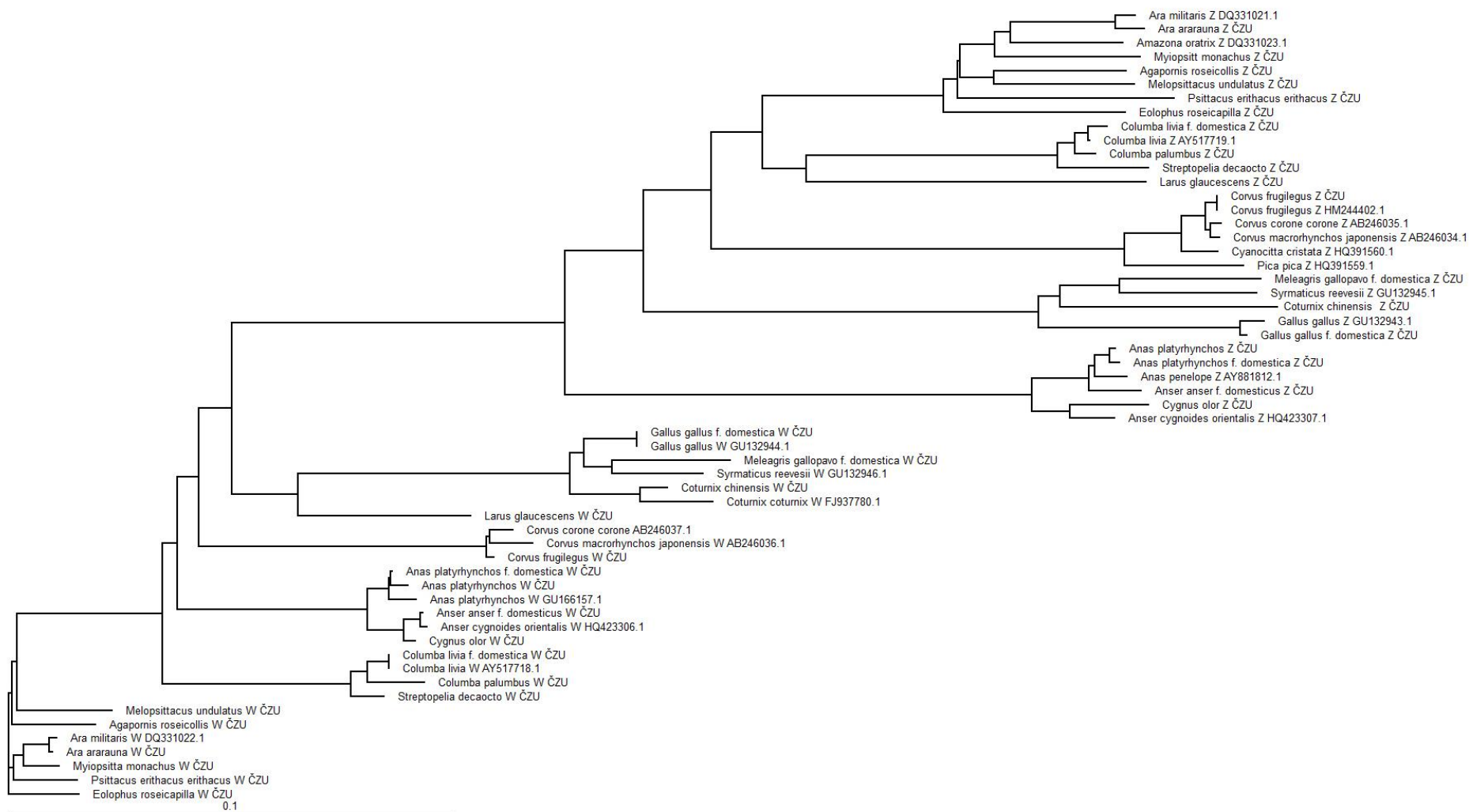
Obrázek 32: Fylogram sestavený na základě porovnání sekvencí celého amplikonu vymezeného primery 2550F – 2718R u gonozómu Z



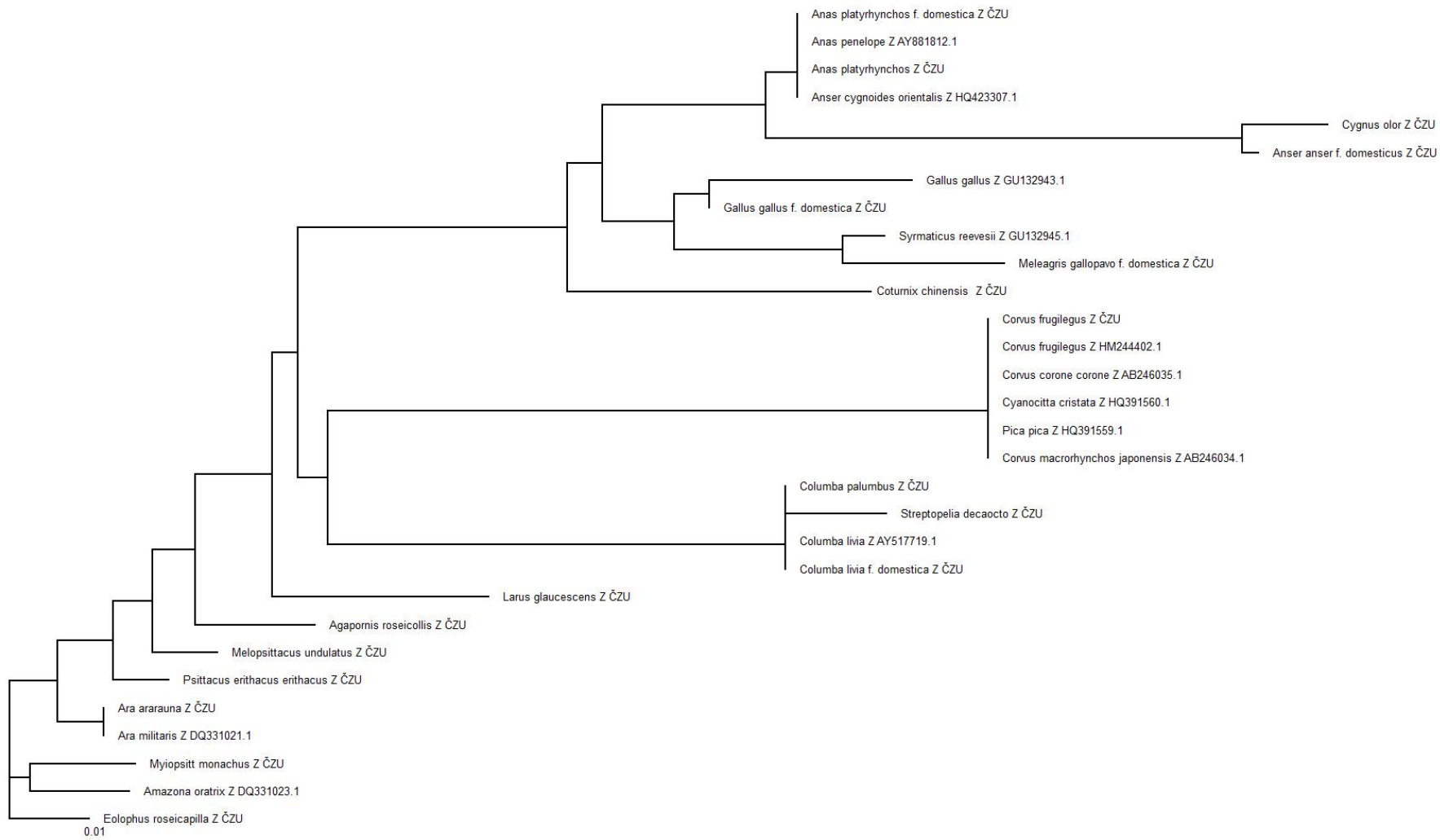
Obrázek 33: Fylogram sestavený na základě porovnání sekvencí celého ampikonu vymezeného primery 2550F – 2718R u gonozómu W



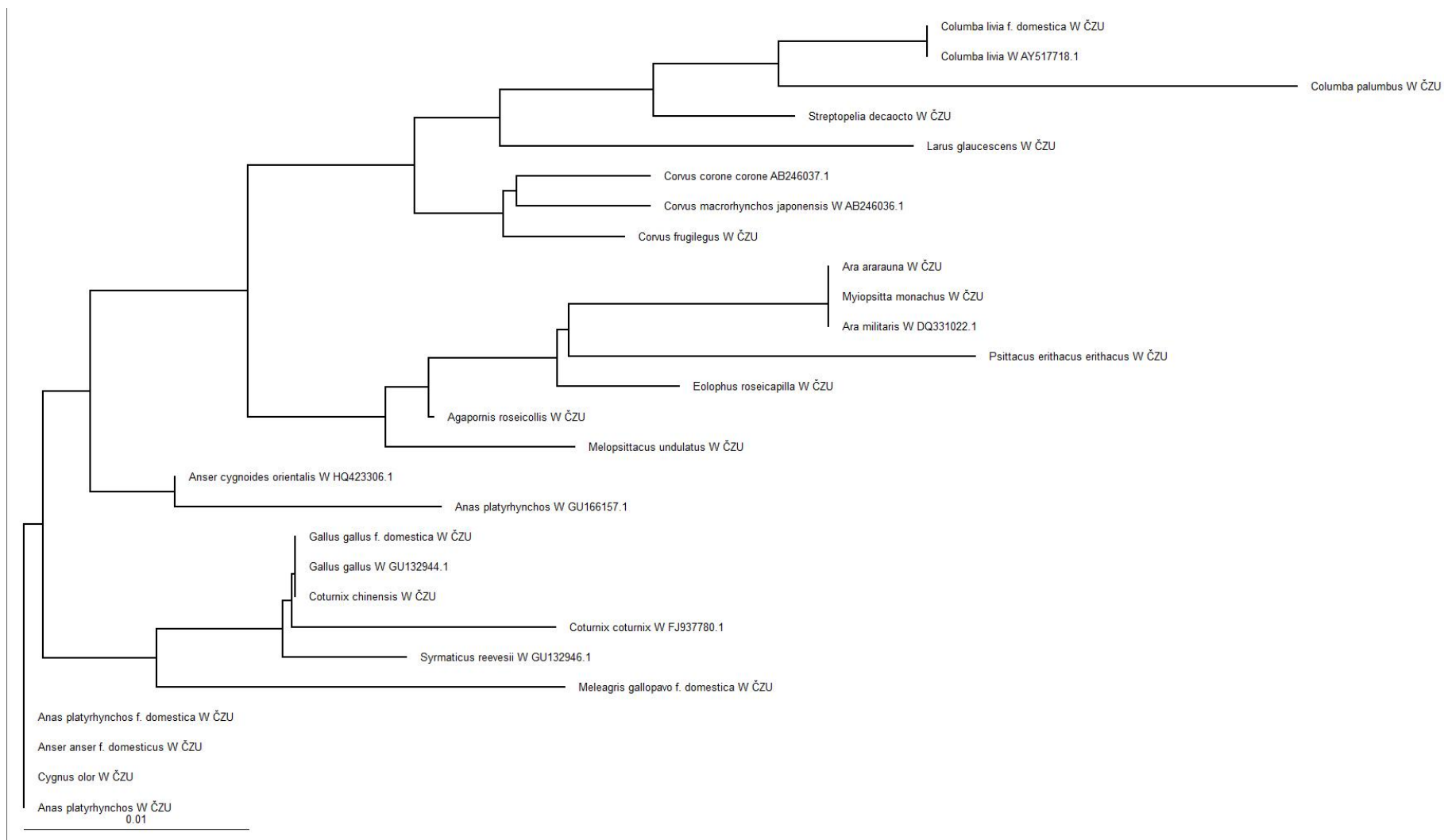
Obrázek 34: Fylogram sestavený na základě porovnání sekvencí celého amplikonu vymezeného primery 2550F – 2718R u gonozómů Z a W



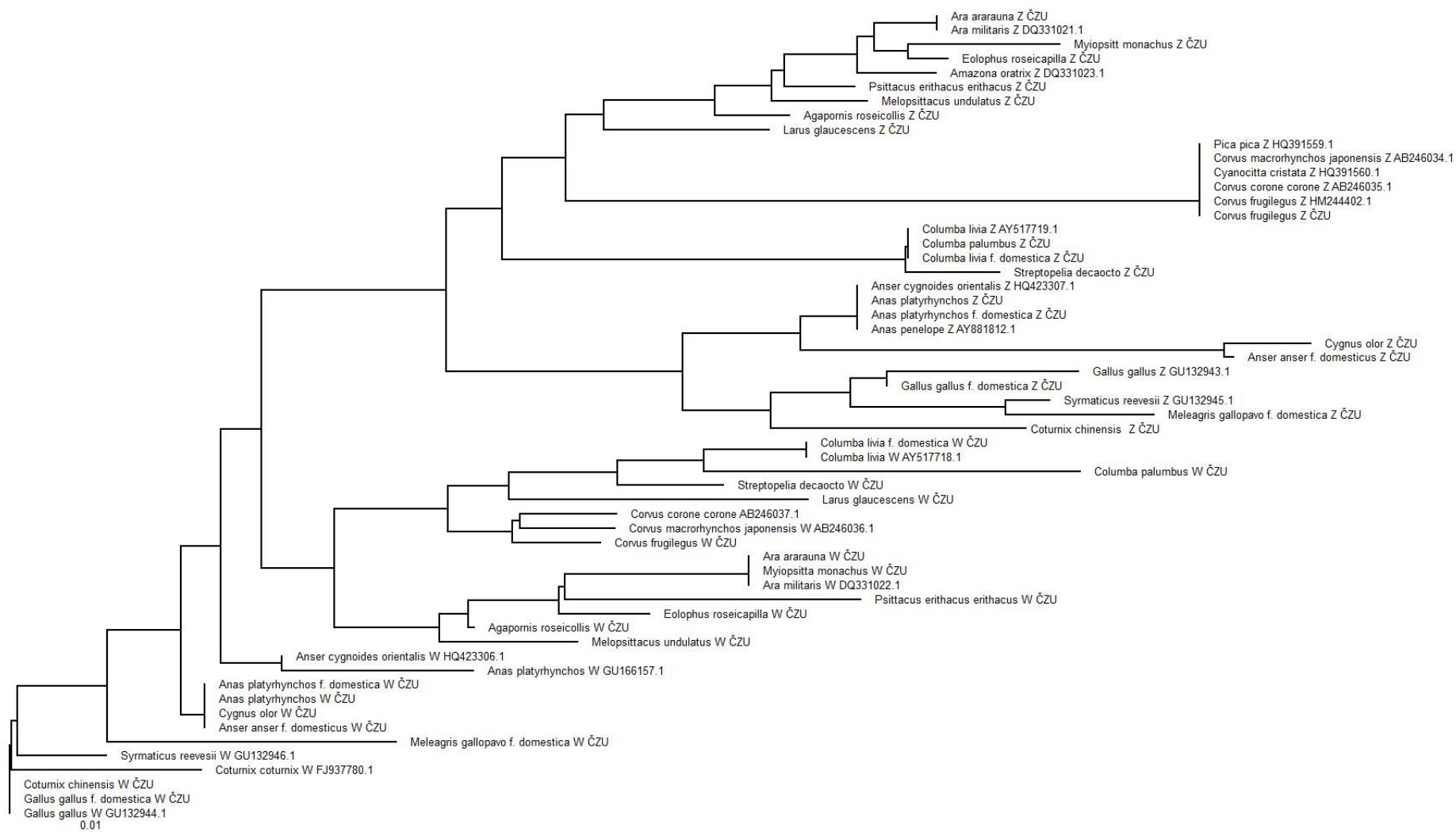
Obrázek 35: Fylogram stanovený na základě sekvencí částečných CDS gonozómu Z



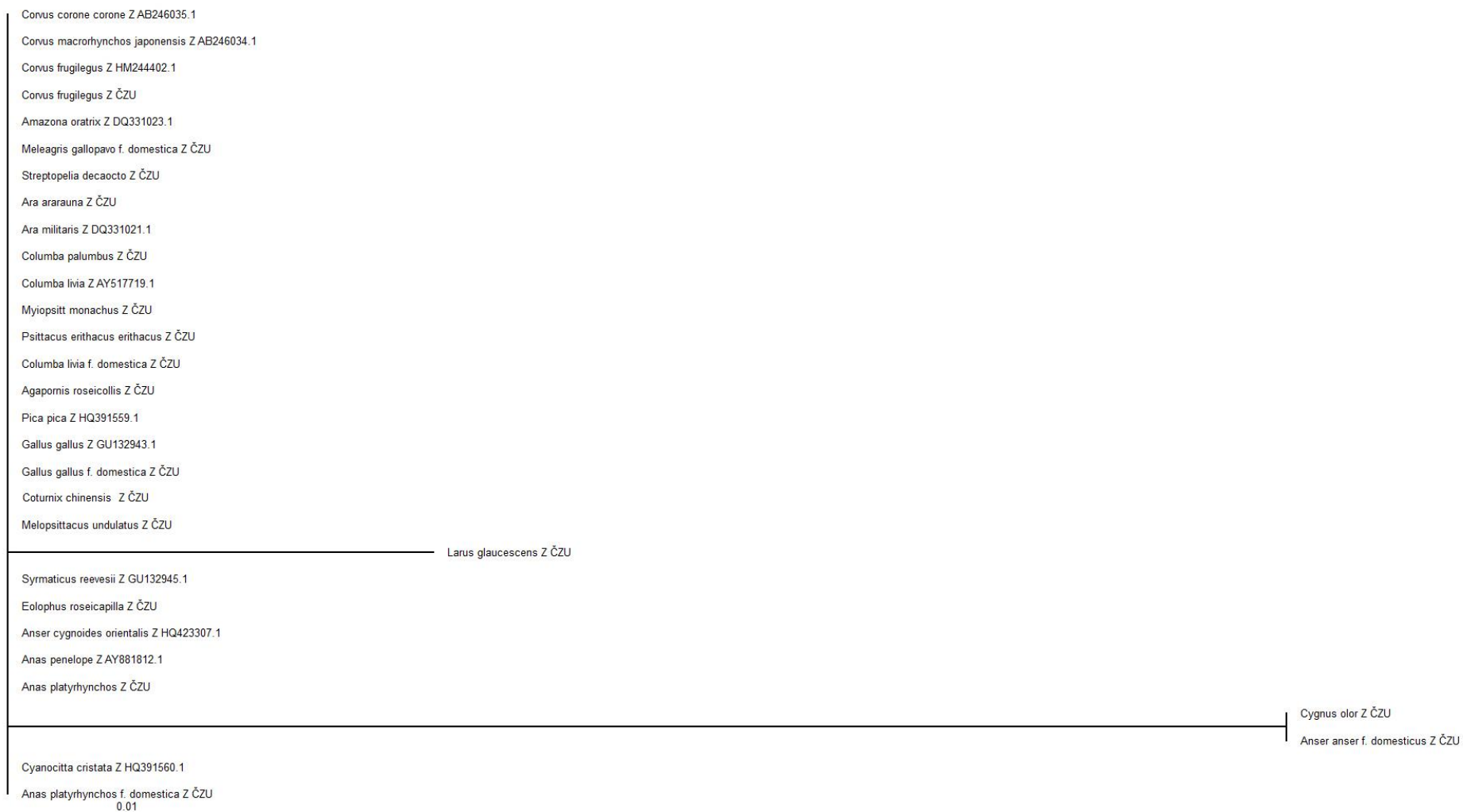
Obrázek 36: Fylogram stanovený na základě sekvencí částečných CDS gonozómu W



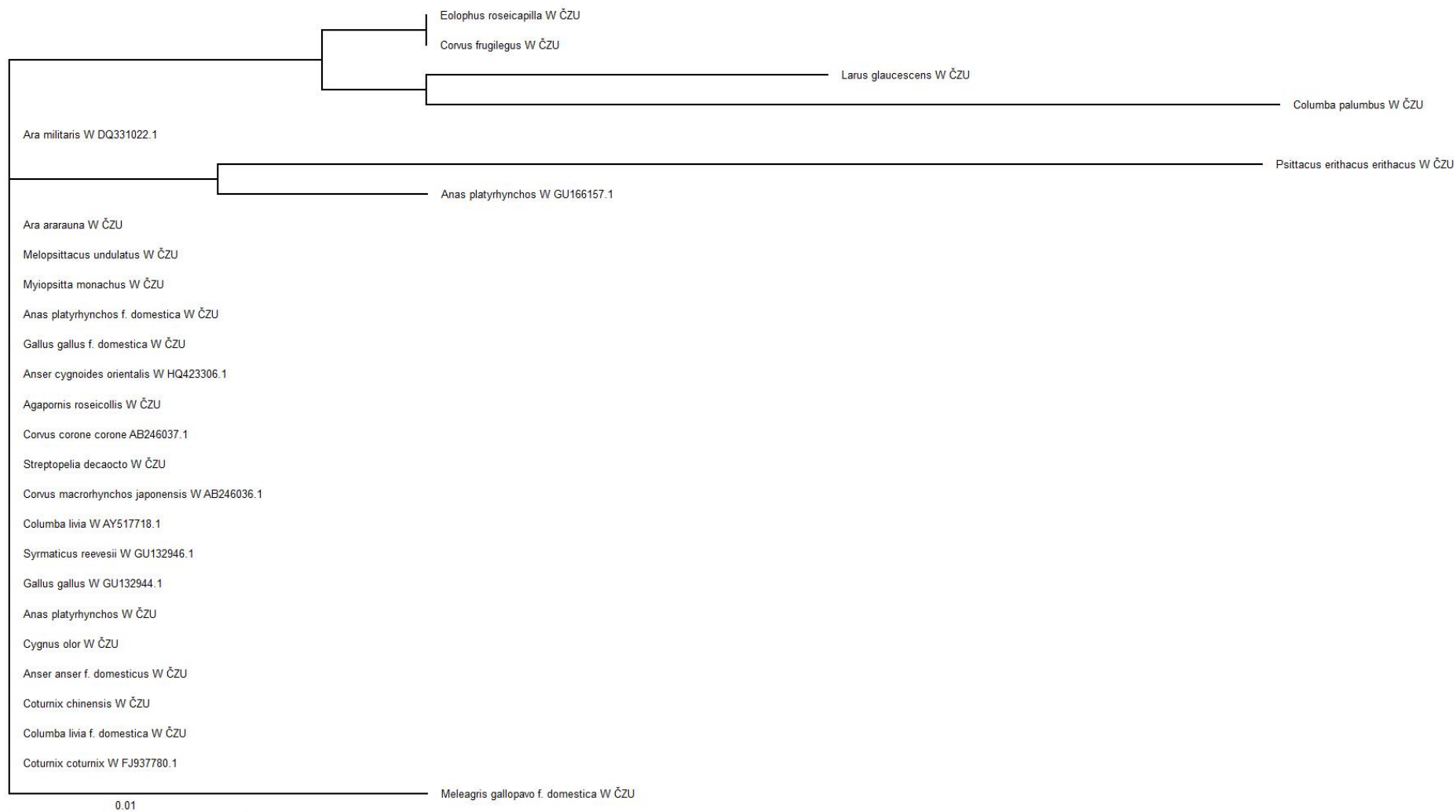
Obrázek 37: Fylogram stanovený na základě sekvencí částečných CDS gonozómu Z a W



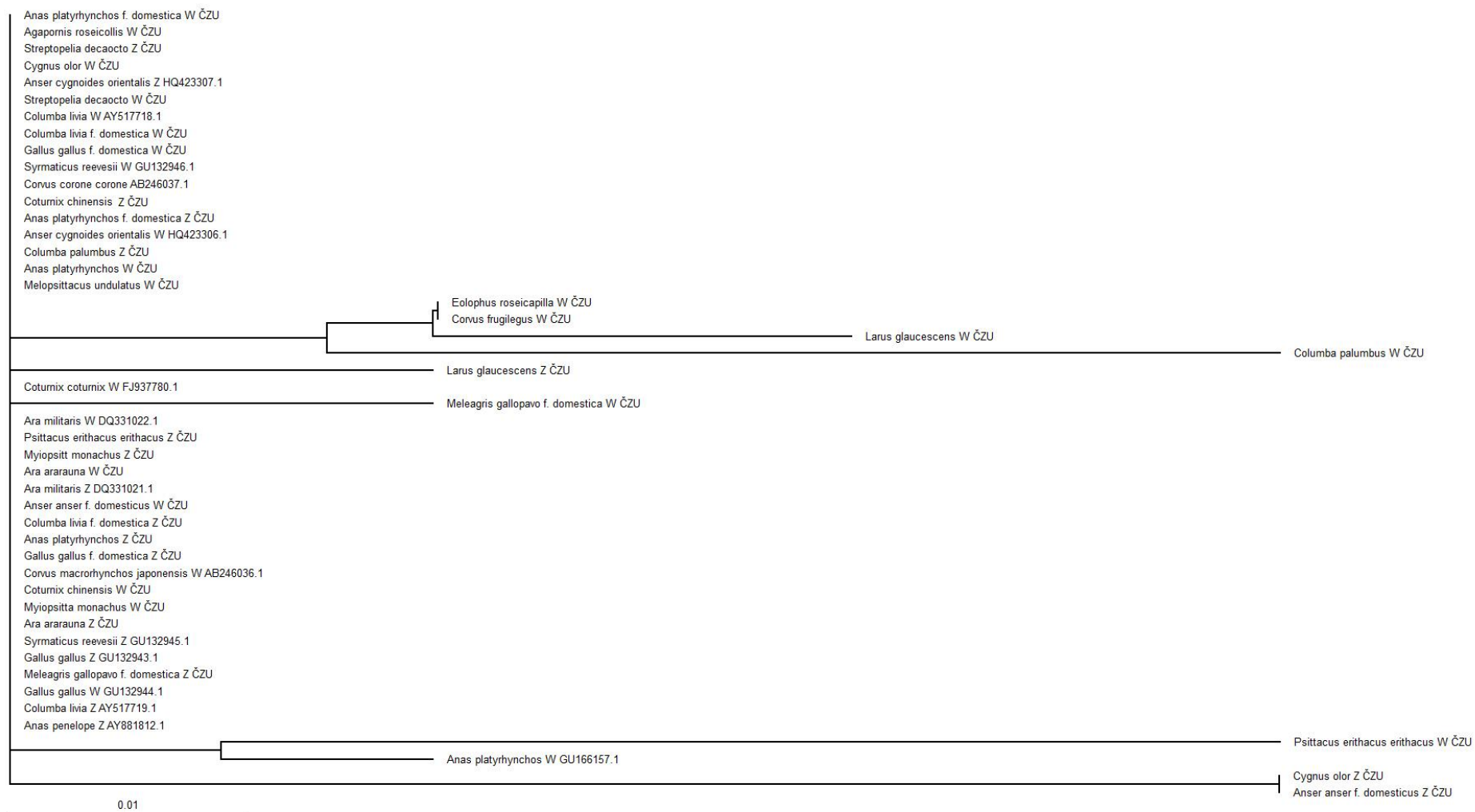
Obrazek 38: Fylogram stanovený na základě predikovaných aminokyselinových sekvencí podle CDS gonozómu Z



Obrázek 39: Fylogram stanovený na základě predikovaných aminokyselinových sekvencí podle CDS gonozómu W



Obrázek 40: Fylogram stanovený na základě predikovaných aminokyselinových sekvencí podle CDS gonozómů Z a W

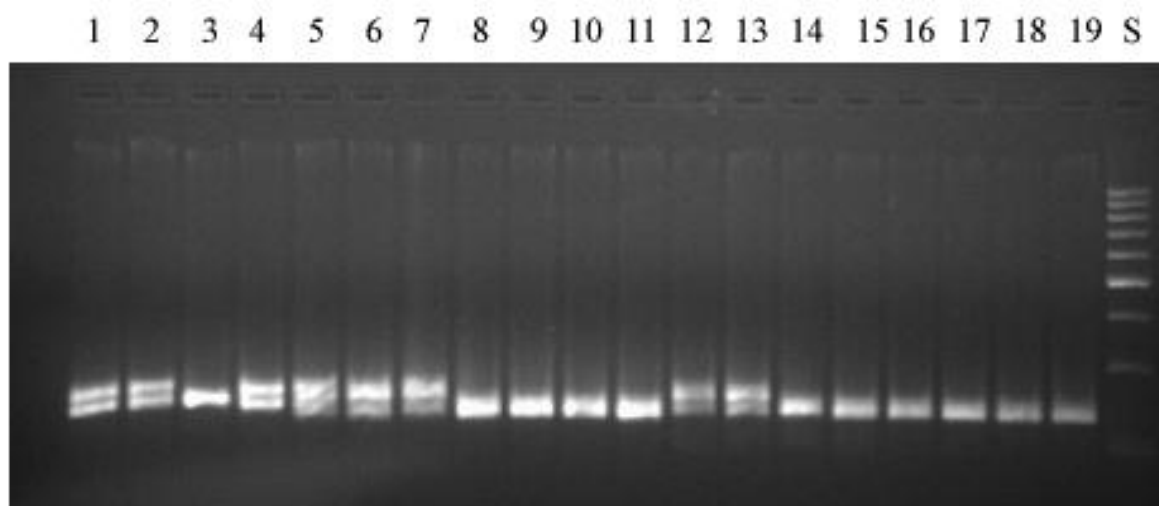


5.3 Vyhodnocení PCR markeru pohlaví ptáků při použití markeru P2 – P8 podle Griffiths et al. (1998)

5.3.1 Výsledky elektroforetické detekce polymorfismu markeru P2 – P8

Griffiths et al. (1998) předpokládají, že produktem amplifikace by měly být rovněž dva různě velké fragmenty u samičích jedinců. U samců se předpokládá vznik jednoho amplikonu, který je na rozdíl od markeru 2550F – 2718R shodně velkým jako menší fragment samic. Tento výsledek odpovídá skutečnosti, že intron aplikovaný primery P2 – P8 je kratší u gonozómu Z, oproti intronu gonozómu W. Pro elektroforetické vyhodnocení tohoto markeru, byla použita stejná separace, jako u markeru 2550F – 2718R. Velikostní rozdíly mezi amplikony byly patrné až po separaci trvající 150 minut. Během dlouhé separace však docházelo k deformaci zón elektroforeogramu. Tento výsledek je patrný z následujícího obrázku 41.

Obrázek 41: Vzorový elektroforeogram PCR markeru P2 – P8 genu CHD1 u vybraných ptáků



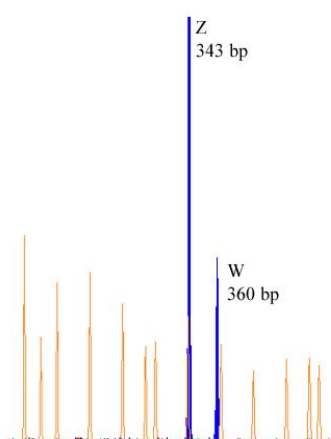
Komentář k obrázku 41: dráha 1 – 2 kur domácí samice, 3 kur domácí samec, 4 kur domácí samice, 5 – 7 krocan domácí samice, 8 – 11 krocan domácí samec, 12 – 13 kachna domácí samice, 14 – 15 kachna domácí samec, 16 – 19 husa domácí samec, S – hmotnostní standard Generuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

5.3.2 Aplikace kapilární elektroforézy pro vyhodnocení polymorfismů markeru P2 – P8

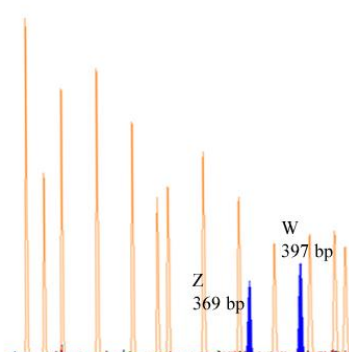
Vzhledem k tomu, že elektroforetická detekce polymorfismu tohoto markeru nepřinesla dostatečně kvalitní výsledky, byl navržen způsob identifikace alel tohoto markeru pomocí kapilární elektroforézy. Na následujícím obrázku 42 jsou uvedeny chromatogramy samic určenými velikostmi jednotlivých píků.

Obrázek 42: Alely markeru P2 - P8 u samic hodnocených druhů ptáků stanovené pomocí kapilární elektroforézy – 1. část

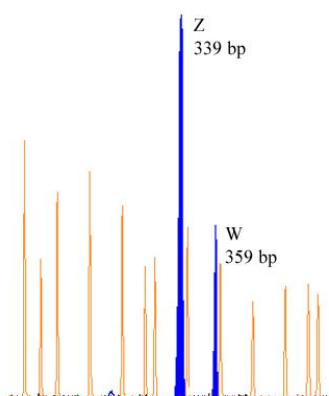
Gallus gallus f. domestica



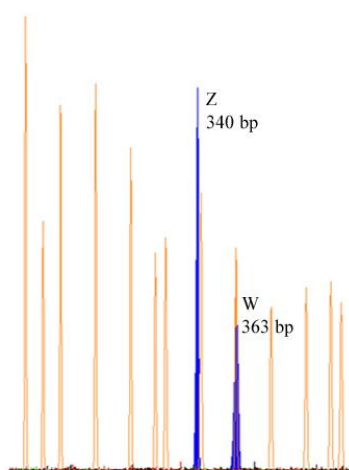
Coturnix chinensis



Meleagris gallopavo f. domestica

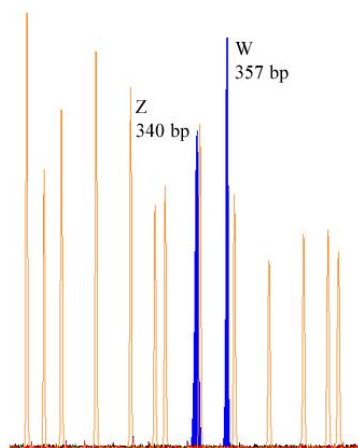


Cygnus olor

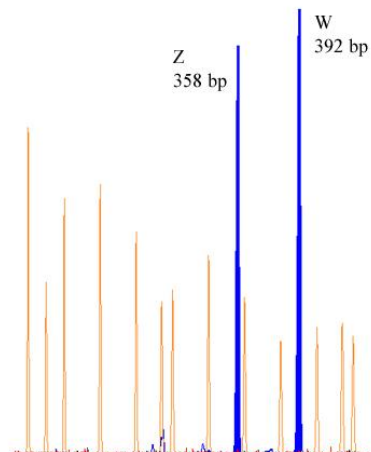


Obrázek 42: Alely markeru P2 - P8 u samic hodnocených druhů ptáků stanovené pomocí kapilární elektroforézy – 2. část

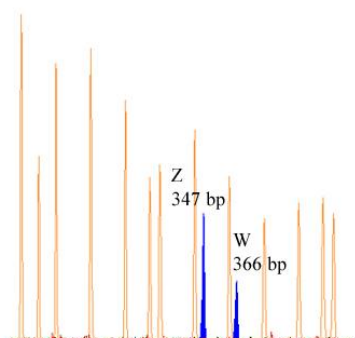
Anas platyrhynchos



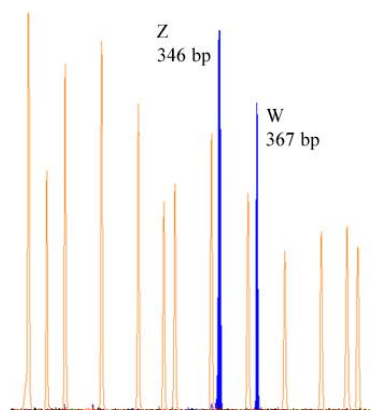
Larus glaucescens



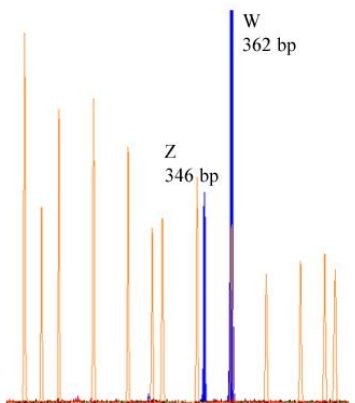
Columba livia f. domestica



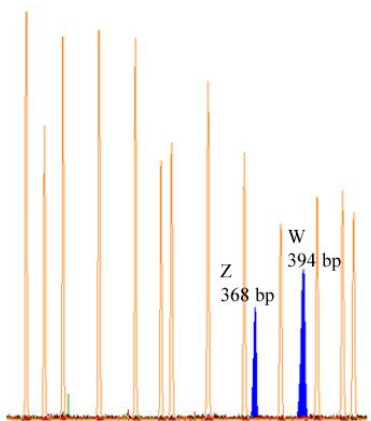
Columba palumbus



Streptopelia decaocto

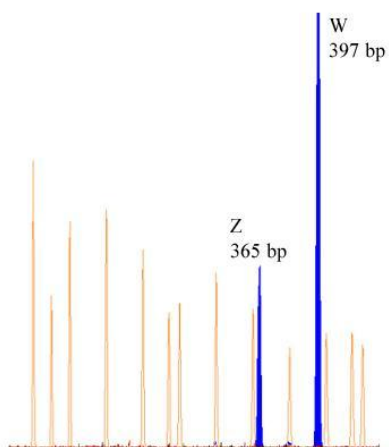


Ara ararauna

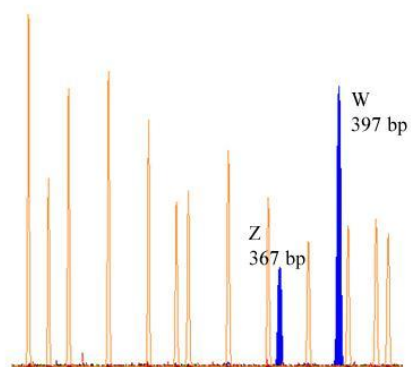


Obrázek 42: Alely markeru P2 - P8 u samic hodnocených druhů ptáků stanovené pomocí kapilární elektroforézy – 3. část

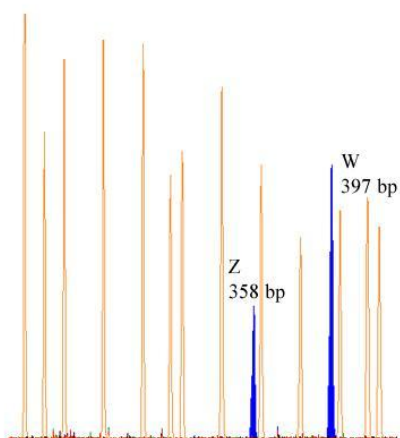
Psittacus erithacus erithacus



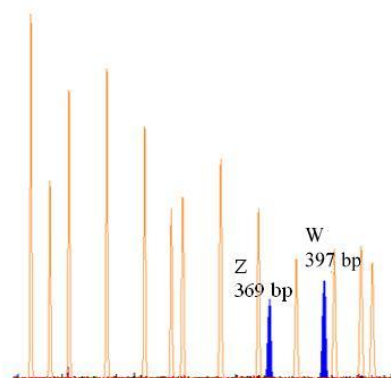
Agapornis roseicollis



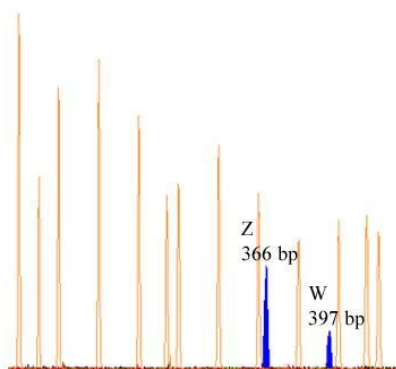
Myiopsitta monachus



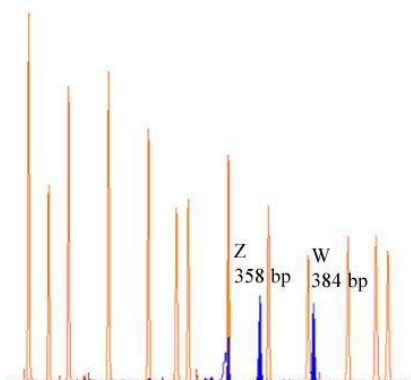
Eolophus roseicapilla



Melopsittacus undulatus



Corvus frugilegus



5.3.3 Stanovení velikosti amplikonu markeru P2 – P8

Z výsledků kapilární elektroforézy v uvedené předchozí kapitole, byly odečteny přesné velikosti amplikonu, které odpovídají Z respektive W alele genu CHD1. Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 12.

Tabulka 12: Velikosti amplikonů markeru P2 – P8 pro gonozómy Z a W

Český název	Vědecký název	Z (bp)	W (bp)
agapornis růžohrdlý	<i>Agapornis roseicollis</i>	367	397
andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	366	397
ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>	368	394
havran polní	<i>Corvus frugilegus</i>	358	384
holub domácí	<i>Columba livia f. domestica</i>	347	366
holub hřivnáč	<i>Columba palumbus</i>	346	367
hrdlička zahradní	<i>Streptopelia decaocto</i>	346	362
husa domácí	<i>Anser anser f. domesticus</i>	340	359
kachna divoká	<i>Anas platyrhynchos</i>	340	357
kachna domácí	<i>Anas platyrhynchos f. domestica</i>	340	357
kakadu růžový	<i>Eolophus roseicapilla</i>	369	397
krocan domácí	<i>Meleagris gallopavo f. domestica</i>	339	359
křepelka čínská	<i>Coturnix chinensis</i>	369	397
kur domácí	<i>Gallus gallus f. domesticus</i>	343	360
labuť velká	<i>Cygnus olor</i>	340	363
papoušek mniší	<i>Myiopsitta monachus</i>	358	397
racek šedokřídlý	<i>Larus glaucescens</i>	358	392
žako šedý	<i>Psittacus erithacus</i>	365	397

6 Diskuze

6.1 Volba výchozího biologického materiálu a metody izolace DNA

6.1.1 Biologický materiál určený pro izolaci DNA

Ze studia vědecké literatury, která je zaměřená na problematiku aplikace DNA markerů pro identifikaci pohlaví ptáků vyplývá, že různí autoři zvolili pro své experimenty různé typy biologických materiálů, které byly získávány invazivním i neinvazivním způsobem. Mezi invazivní způsob odběru biologického materiálu určeného k izolaci DNA patří takové zásahy, které obvykle provádí veterinární lékař. Mezi typické invazivní metody patří odběry krve. Krev jako výchozí biologický materiál použili pro izolaci DNA například Itoh et al (2001), Huynen et al. (2002), Peters et al. (2005), Fukui et al. (2008) nebo Mu – Yeong et al. (2008).

Vzorky krve byly použity přímo bez přidání antikoagulačních látek, DNA byla izolována z krevní sraženiny. Tento postup použili například Huynen et al. (2002) u pštrosovitých.

Další autoři doporučují při odběru krve ptáků používat některé antikoagulační látky. Tento postup použili například Itoh et al. (2001), kteří izolovali DNA z heparinizované krve. Při řešení bakalářské práce, jsem nepoužil pro izolaci DNA krev. Důvodem byla skutečnost, že u některých druhů ptáků – velkých papoušků, se jednalo o jedince chované v zajetí, které nebylo vhodné stresovat veterinárním zákrokem.

Za invazivní způsoby získání biologického materiálu lze považovat i izolaci DNA z ostatních tkání, které byly získány například při pitvě a anatomických studiích různých druhů ptáků. Tento způsob získání biologického materiálu použili například Ito et al. (2003). Tito autoři získali kvalitní vysokomolekulární DNA z prsních svalů a buněk ledvin u motáků, orlů, jestřábů a sokolů.

Za invazivní způsob získání výchozího biologického materiálu lze považovat i některý materiál, který jsem použil při řešení bakalářské práce. Jedná se o vzorky izolované z krční, srdeční, žaludeční svaloviny a z jaterních buněk. Pro získání tohoto biologického materiálu při řešení bakalářské práce nebyla potřeba veterinárního lékaře. Výše uvedené tkáně byly

získány z komerčně prodávaných drobů, jako takzvaná chlazená drůbež. Z výsledků bakalářské práce vyplývá, že i takovýto netradiční materiál použitý pro genetické experimenty poskytl velké množství DNA. To znamená, že období od porážky zvířete do zakoupení produktu nebyla DNA degradována. Cílem experimentů využívajících výše popsané tkáně pro izolaci DNA, bylo rovněž ověřit, zdali jednotlivé droby (krky, srdce, játra a žaludky) se nemohly vzájemně kontaminovat během distribuce. Mám na mysli kontaminace na úrovni DNA. Pro omezení povrchové kontaminace byly vzorky před odběrem materiálu individuálně a důkladně opláchnuty ve fyziologickém roztoku. Tkáně používané pro extrakci DNA nebyly odebírány z povrchových částí. PCR testy jednoznačně prokázaly, že ke kontaminaci vzorků nedocházelo, protože v rámci jednoho balení drobů se nacházelo například více žaludků a pohlaví jedince bylo u každého žaludku spolehlivě a jednoznačně detekováno.

Někteří autoři, kteří se zabývají populačními analýzami, používají pro izolaci DNA zbytky tkání ptáků uhynulých přirozeným způsobem a nalezených v různých přírodních lokalitách. Tento postup použili například: Peters et al. (2005), kteří izolovali DNA z populací různých zástupců čeledi *Anatidae*. Pro své analýzy použili například šupiny z nohou, ze kterých izolovali dostatečné množství DNA použitelné pro molekulární analýzy.

Za neinvazivní metody odběru biologického materiálu nejsou považovány takové postupy, které výrazně nestresují zvíře a které může provádět například chovatel bez asistence veterinárního lékaře. U savců patří mezi jednu z nejběžnějších neinvazivních metod odběr bukálních buněk. Tento postup je založený na vsunutí cytologického kartáčku do ústní dutiny a setření povrchových buněk ze sliznic tváří. U ptáků tento způsob nepatří mezi nejčastější metody a to zejména z důvodu poměrně malého ústního otvoru a poměrně obtížné manipulovatelnosti s jedinci. Použití odběru bukálních buněk popisují u některých sov Brubaker et al. (2011). Místo cytologických kartáčků použili komerčně vyráběné buničtinové tamponky na tyčinkách.

Za typickou neinvazivní metodu odběru biologického materiálu lze považovat získání per hodnocených ptáků. Při izolaci DNA z tohoto materiálu lze využít dvě strategie. Pro analýzu lze použít rostoucí pera, která jsou naplněná krvavou dření. Tento způsob izolace DNA v podstatě představuje izolaci DNA z krve. Tento postup popisují například Peters et al. (2005) a Fukui et al. (2008). Řada veterinárních laboratoří považuje právě DNA izolovanou z takovýchto rostoucích per za vhodnou pro molekulární identifikaci pohlaví ptáků. Tento požadavek na výchozí biologický materiál popisují například Kučerová a Vodička (2009),

kteří popisují analýzy prováděné firmou Genexone, s.r.o Olomouc. Tento typ výchozího biologického materiálu byl použit v bakalářské práci u řady hodnocených druhů. Z výsledků kvantifikace takto izolované DNA vyplynula její vyšší výtěžnost. Jako rostoucí brka nebylo nutné použít velká pera letek nebo ocasu, která by teoreticky mohla způsobit výraznější krvácení. Bylo prokázáno, že pro získání dostatečného množství kvalitní DNA postačí použít i čerstvě rostoucí drobná pírky z oblasti hlavy, nebo hřbetu přepeřujícího jedince.

Někteří z autorů, používají pro své analýzy již dorostlá pera, která jsou buďto vytržena z jednotlivých ptáků, nebo která pocházejí z nálezů v přírodě. Tento druh biologického materiálu použili například u tučňáků Costantini et al. (2008) a Fukui et al. (2008). Problematikou kvality a kvantity izolované DNA z peří a krve ptáků se zabývají například Havey et al. (2006). Tito autoři dospěli ke stejnému závěru jako při řešení bakalářské práce, že z čerstvých tkání obsahujících somatické nebo krevní buňky lze získat vždy větší množství DNA. Izolace DNA z vypadlých per je založena na tom, že i v peru s ukončeným růstem se mohou nacházet oblasti obsahující buňky použitelné pro izolaci DNA. Prvním takovým místem je oblast v dutině brku v místě před vyrůstajícím praporem. V této části brku se může nacházet tmavě červená krevní sraženina, která vzniká při ukončení růstu. Typická krevní sraženina je demonstrována na obrázku 15 u letky ary ararauny. Dalším možným výskytem buněk obsahující DNA, je podle výše uvedených autorů samotný hrot ostenu, kde se zejména u čerstvě vytržených nebo u čerstvě vypadlých per mohou nacházet zbytky kožních buněk. Z metodické části vyplývá, že krevní sraženina byla použita pro izolaci DNA. Rád bych však poznamenal, že výskyt krevní sraženiny nebyl charakteristický pro všechna přirozeně vypadlá pera. Například u holuba hřivnáče bylo nasbíráno celkem 130 letek, z nichž pouze 21 vykazovalo viditelnou krevní sraženinu. U labutě velké z 80 získaných letek obsahovalo krevní sraženinu pouze 15. U ary ararauny bylo získáno 15 letek, z nichž pouze jedna obsahovala krevní sraženinu. Výskyt krevní sraženiny byl sledován i v letkách a ocasních perech drobnějších ptáků, jako je například agapornis různohrdlý. V tomto případě žádné z hodnocených per neobsahovalo viditelnou sraženinu. Při řešení bakalářské práce bylo potvrzeno, že velikost krevní sraženiny je závislá na tloušťce brku a velikosti daného ptačího druhu. U druhů s větší velikostí jako je například labuť velká, nebo ara ararauna, byla sraženina výrazně větší a z toho vyplývá větší množství izolované DNA oproti druhům s menším průměrem brků. Při řešení bakalářské práce jsem použil postup založený na aseptické preparaci brku, kdy sterilními nůžkami byl brk rozstřížen viz obrázek 15 a preparační jehlou byla červeně zbarvená sraženina přenesena do zkumavky. Jiní autoři jako

například Konstantini et al. (2008) používají pro extrakce DNA celé odstřižené části brku, včetně keratinových částí.

6.1.2 Metody izolace DNA

Z odborné literatury vyplývá, že různí autoři použili pro izolaci genomické DNA určené pro identifikaci pohlaví různé metodické postupy. Někteří z autorů doporučují izolovat DNA pomocí extrakčního pufru, obsahujícího dodecylsírán sodný (SDS). Tento postup pro izolaci DNA z vypadlých per popisuje například Harvey et al. (2006) a Fukushima et al. (1999). Tito autoři považují SDS metodu izolace DNA za velice levnou a spolehlivou. Části per jsou inkubovány v SDS pufru s přidavkem proteinázy K při 56°C přes noc. Extrahovaná DNA je následně purifikována fenol – chloroformovou metodou. Tento postup použili například při izolaci DNA z peří u rodu *Corvus* (Fukui et al. 2008). SDS metodu u různých druhů ptáků včetně kachen, sovice sněžné, turako, pěnkav a špačků použili Itoh et al. (2001).

Další skupina autorů využívá pro izolaci DNA komerčně vyráběné izolační kity. Například Mu – Yeong et al. (2008) použili pro izolaci DNA z tkání a krevních vzorků východoasijských druhů ptáků DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Shodný kit použili rovněž Peters et al. (2005) pro izolaci DNA z různých tkání u rodu *Anas*. Izolaci genomické DNA z části brku o délce 0,3 cm u tučňáků pomocí kitu GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep kit (Sigma) použili Costantini et al. (2008).

Při řešení bakalářské práce byl rovněž zvolen postup izolace DNA pomocí kitu. Pro experimenty byl použit kit NucleoSpin® Tissue XS (Machery – Nagel). Tento kit, stejně jako kity které použili Mu – Yeong et al. (2008), Peters et al. (2005) a Costantini et al. (2008), pracuje na principu lýze buněk pomocí pufru s proteinázou K a na následné purifikaci DNA kolonkovým způsobem. Při řešení bakalářské práce bylo ověřeno, že tento kit lze s úspěchem použít pro izolaci DNA z různého biologického materiálu. Jeho nevýhodou je vyšší cenová náročnost ale současně tento kit představoval záruku pro získání kvalitní genomické DNA za konstantních izolačních podmínek. Kvalita izolované DNA byla při řešení bakalářské práce potvrzena tím, že extrahovaná DNA fungovala u všech vzorků jako bezproblémový templát pro PCR.

6.2 Polymorfismus PCR markeru 2550F – 2718R

6.2.1 Metody stanovení polymorfismů PCR markeru 2550F – 2718R

Marker 2550F – 2718R CHD1 genu patří mezi jeden z nejčastěji používaných molekulárních postupů pro identifikaci pohlaví ptáků. Světcí o tom i velké množství autorů, kteří tento marker použili ve svých pracech.

Experimentální část bakalářské práce vycházela z ověření experimentálních postupů, které použili například Peters et al. (2005), Cortes et al (1999), Khan et al. (1998), Garcia a Mindell (2003), Sundstrom et al. (2003), Tokunaga et al. (2007), Brubaker et al. (2011), Bartosch et al. (2003), Berlin et al. (2006), Montell et al. (2001), Fukui et al. (2008). Všichni tito autoři použili pro identifikaci rozdílu mezi amplikony agarózovou geleovou elektroforézou v prostředí 1 x TBE pufru. Koncentrace gelu se u těchto autorů pohybovala v rozmezí od 2 do 3%. Výše uvedení autoři použili obvykle pro vizualizaci elektroforeogramu ethidium bromid. Stejný postup byl použit i při řešení své bakalářské práce.

Metoda detekce polymorfismů pomocí gelové elektroforézy se u tohoto markeru ukázala jako zcela vhodná. Úspěšnost aplikace agarózové gelové elektroforézy souvisí s poměrně velkými rozdíly mezi velikostmi amplikonů mezi gonozómy Z a W. Tyto výsledky jsou patrné se souhrnné tabulky 11. Například u holuba hřivnáče byl zjištěn rozdíl mezi gonozómy odpovídající 248 bp. Vhodnost elektroforetické detekce u tohoto markeru vyplývá rovněž z obrázku 21, na kterém je uveden vzorový elektroforeogram.

V bakalářské práci je provedena přesnější charakterizace získaných amplikonů, než je jejich pouhý odhad na základě porovnání s hmotnostním standardem. Postup odhadu velikosti fragmentu pouhým srovnáním hmotnostním standardem však používá řada výše citovaných autorů. Mnohdy jejich závěry pouze konstatují, že u daného druhu ptáků bylo provedeno odlišení samců a samic a to pouze na principu existence dvou aplikonu u jedinců samčího pohlaví a jednoho aplikonu u jedinců samčího pohlaví.

6.2.2 Sekvenční variabilita PCR markeru 2550F – 2718R

Z důvodu bližší charakterizace amplikonů byla v bakalářské práci provedena sekvenace aplikonu genu CHD1, který byl vymezen dvojicí primerů 2550F – 1718R. Byly získány sekvence u druhů, které byly sekvenovány již jinými autory (kur domácí, krocán domácí, kachan divoká, holub domácí, holub hřivnáč a havran polní). Sekvenační analýza byla provedená u dalších druhů, které nebyly na základě sekvenčních analýz studovány. Jedná se o křepelku čínskou, labuť velkou, kachnu domácí, husu domácí, hrdličku zahradní, aru

araraunu, papouška mnišího, agapornise různohrdlého, žaka šedého, kakadu růžového a andulku vlnkovanou.

Sekvenační analýzu amplikonu použili ve svých pracech například následující autoři: Peters et al. (2005), Cortes et al (1999), Khan et al. (1998), Garcia a Mindell (2003), Sundstrom et al. (2003), Tokunaga et al. (2007), Brubaker et al. (2011), Bartosch et al. (2003), Berlin et al. (2006), Montell et al. (2001), Fukui et al. (2008), Suh et al. (2011), Tokunaga et al. (2007). Tabulka 1 svědčí o tom, že genetici a ornitologové se zabývají molekulární detekcí pohlaví ptáků u široké škály taxonu. Mezi časté modelové druhy pro tyto experimenty patří papoušci, u kterých je obtížné identifikovat pohlaví na základě znaků pohlavního dimorfismu. O této skutečnosti rovněž svědčí údaje uvedené v tabulce 1. Důvod můžeme spatřit, že identifikace pohlaví zejména u velkých papoušků pomocí molekulárních markerů může být komerčně využita – řada genetických laboratoří nabízí komerční test molekulární detekce pohlaví. Například plzeňská firma Genomia nabízí kromě jiných analýz u ptáků rovněž molekulární testaci pohlaví na základě genetických markerů, které byly použity v této bakalářské práci. Na obrázku 43 je dokumentován nabídkový list výše uvedené firmy.

Obrázek 43: Nabídka firmy Genomia pro identifikaci pohlaví ptáků – www.genomia.cz

GENOMIA
genetic laboratory

Česky | English | Deutsch

Ptáci

Naše nabídka
[Přehled služeb](#)
[Ceník služeb](#)
[Výšetření pro psy](#)
[Výšetření pro kočky](#)
[Barvy srsti u psů](#)
[Barvy srsti u koní](#)
[Výšetření pro ptáky](#)
[Výšetření patogenů](#)
[Tematické stránky vbraných psích plemen](#)
[Genealogické DNA testy](#)

Informace pro zákazníky
[Pokyny k odběru vzorků zvířecích vzorků](#)
[Formuláře ke stažení](#)
[Všeobecné obchodní podmínky](#)
[Reference](#)
[Přehled nemocí psů](#)
[Slovník pojmů](#)
[Často kladené dotazy](#)

Laboratoř Genomia
[O nás](#)
[Kvalita](#)

Kontakty
[Adresa a mapa](#)
[Facebook](#)
[Blog](#)

Nabídka testů pro ptáky

Počet vzorků	Stanovení pohlaví	APV+PBFD	Chlamydie	Chlamydie +APV+PBFD	Pohlaví + chlamydie	Pohlaví + APV+PBFD	Pohlaví + APV+PBFD +chlamydie
1-5	365	690	690	1100	990	990	1490
6-15	335	580	580	1030	880	880	1390
16-25	315	510	510	950	750	750	1290
26 <	290	450	450	880	590	590	1190
	Objednat	Objednat	Objednat	Objednat	Objednat	Objednat	Objednat

Ceny včetně DPH.
 Ceny kombinovaných testů jsou platné v případě, že jsou provedeny z jednoho vzorku (i smíšeného).
 Výsledky testů patogenů jsou do tří dnů, výsledky testů pohlaví jsou do týdne.
 Množstevní slevy od 15 kusů výše budou zohledněny při potvrzení objednávky.
 Typy vzorků vhodné pro jednotlivá stanovení jsou uvedeny na stránkách příslušných testů.

Stanovení genetického profilu a příbuznosti:
[Genetický profil u jestřábů lesních \(Accipiter gentilis\)](#)
 Genetický profil u papoušků - připravuje se na podzim 2013

6.2.3 Výsledky plynoucí z fylogramů stanovených na základě PCR markeru 2550F – 2718R

Získané sekvence ampliconu byly vzájemně porovnány pomocí programu ClustalX. Z obrázků 22 a 23 je patrné, že různí autoři do mezinárodní nukleotidové databáze NCBI umístili různě dlouhé sekvence markeru 2550F – 2718R. Z těchto důvodů bylo provedeno porovnání sekvencí podle schématu uvedeného v metodické a výsledkové části bakalářské práce. Z obrázků 22 a 23 jsou sice patrné typická mutační místa a oblasti delecí a inzercí, přesto tento způsob grafického vyjádření nepodává jasný obraz o sekvenčních podobnostech. Z těchto důvodů bylo provedeno vyhodnocení sekvencí pomocí fylogramové studie. Pro zpracování vstupních dat byl použit postup, který pro obdobné typy analýz doporučují Thompson et al. (1997) a Jeanmougin et al. (1998). „Multiple – Alignment“ získaných sekvencí byl proveden na základě 1000 „bootstrapů“. Stejně zpracování vstupních dat použili například Peters et al. (2005).

Pro fylogenetické studie je obvykle využíváno sekvenčních polymorfismů větší části genomu. Peters et al. (2005) pro fylogenetické studie u rodu *Anas* zahrnuli kromě sekvencí genu CHD1 rovněž i sekvence mitochondriálního genomu. Cílem bakalářské práce bylo pouze ověřit, zdali ve fylogramech bude nalezena souvislost mezi taxonomickým zařazením studovaných druhů. Přestože byla sekvenována pouze nepatrná část ptačího genomu, tato hypotéza byla potvrzena. Fylogramy sestavené ze sekvencí intronu a celých ampliconů tento závěr plně podporují. Získané sekvence byly jednoznačně přiřazeny k sekvencím získaných v databázi NCBI, které odpovídají jednotlivým čeledím.

Zajímavé výsledky vyplývají i z fylogramů, u kterých byly srovnány současně sekvence markeru u Z a W gonozómu. Tyto výsledky jsou dobře patrné zejména z obrázků 31 a 34. Z těchto fylogramů jasně vyplývá, že existuje větší podobnost mezi sekvencemi jednoho gonozómu u různých ptačích druhů než mezi Z a W gonozómy jednoho ptačího druhu. Tento výsledek se shoduje s předpokladem, že gonozómy Z a W jsou sekvenčně poměrně konzervativní napříč různými druhy ptáků (Clinton, 1998, Smith et al. (2007) a Chume Smith, (2011).

Z fylogramů je rovněž patrné společné zařazení papušků do jednotlivých větví, které koreluje s jejich geografickým původem. Tento výsledek je patrný zejména u amerických papoušků (rod *ara*, papoušek mniší), kteří jsou řazeni do stejné skupiny. Do shodné skupiny byli rovněž zařazeni papušci pocházející z Afriky – žako šedý a agapornis růžohrdlý. Získané

výsledky korespondují s původem těchto druhů, který popisují například Abeele (2006), Alderton (2002), Grahl (1984), Kooten (2010), Vašíček (2004), Vašíček (2001),

6.3 Polymorfismus PCR markeru P2 – P8

6.3.1 Metody stanovení polymorfismu markeru P2 – P8

Z tabulky 1 je patrné, že marker P2 – P8 je oproti markeru 2550F – 2718R využíván méně často pro identifikaci pohlaví. U různých druhů ptáků tento marker použili například Cortes et al. (1999), Garcia a Mindell (2003), Kahn et al. (1998) nebo Turk et al. (2007). Tito autoři použili pro detekci polymorfismů separaci markeru v agarózovém gelu. Příčinou může být zřejmě ta skutečnost, že rozdíly mezi amplikony CHD1 genu u gonozómů Z a W jsou menší. To znamená, že pro elektroforetické odlišení dvou amplifikovaných fragmentů je nutné použít koncentrovanější agarózový gel a delší dobu separace. K tomuto závěru jsem se dopracoval i při řešení bakalářské práce. Rozdíly mezi amplikony byly vyhodnotitelné až po 150 minutách separace, kdy současně docházelo k deformaci zón elektroforeogramu. Tento získaný výsledek názorně dokumentuje obrázek 41.

6.3.2 Použití kapilární elektroforézy pro vyhodnocení polymorfismu markeru P2 – P8

Výsledky získané při separaci markeru v agarózovém gelu jsem nepovažoval za dostatečně reprezentativní. Z těchto důvodů byla provedena optimalizace postupu detekce polymorfismů s využitím kapilární elektroforézy. Genetické analyzátoři jsou využívány pro detekce délkových polymorfismů na úrovni jednobázových delecí nebo inzercí. Z tohoto důvodu se technika, jejíž princip popisuje například Kašička (1997), ukázala jako vhodné pro detekci polymorfismů mezi Z a W alelami markeru P2 – P8 genu CHD1.

U tohoto markeru nebyla během řešení bakalářské práce provedena sekvenční analýza. Důvodem bylo zejména horší oddělování amplikonů během gelové purifikace, které je nezbytné pro izolaci fragmentů odpovídajícím haplotypům gonozómů Z a W. Rovněž v mezinárodních nukleotidových databázích se nachází výrazně méně sekvencí tohoto markeru. O spolehlivosti a přesnosti stanovení velikosti fragmentů pomocí kapilární elektroforézy u markeru P2 – P8 svědčí i následující výsledek. U modelového druhu kura domácího byly stanoveny velikosti fragmentů Z 343 bp a W 360 bp. Tento výsledek se plně shoduje se

závěry, který publikoval Griffiths et al. (1998), který provedl rovněž sekvenční analýzu tohoto markeru a který prezentoval výsledky následujícím způsobem.

Obrázek 44: Variabilita délky intronu u markeru P2 – P8 – upraveno podle Griffiths et al. (2008)

```

Mouse      CHD1  CTCCCGAGAA TGAGAAACTG TGCAAAGCAG  N(?)  ATAAGTTTCA ATGGAAGTGA AGGGAGGCG
Chicken    CHD-W  ..T..A.... ..A... N(178) ..C..C..T. ....A... ..AT.'
Chicken    CHD-Z  .....G. ....A... N(161) ..C..C..T. ....G..... ..A..A..'
Zebra Finch CHD-W  T.G..A..G. ....A... N(207) ..C..C..T. ....AA.A'
Zebra Finch CHD-Z  ..T..A.... ..A... N(171) ..T..C.... ....C..... ..A..'
Primer P8          CTCCCAAGGA TGAGRAAYTG

Mouse      CHD1  AGTAGAAGCA GGAGATATTC TGGATCTGAT AGTGATTCAA TCTCGGAAAG GAAACGGCCG
Chicken    CHD-W  ....G.... .A..... .....C. ....A.... A....A..A
Chicken    CHD-Z  ....G.... .A..... .....C..C. .A.A.... A.....A
Zebra Finch CHD-W  ....G..G. .A..... .....C..GG ....A.... A....A..A
Zebra Finch CHD-Z  ....G..T. .A....C.. .....C..C. ....A.... A...A...A

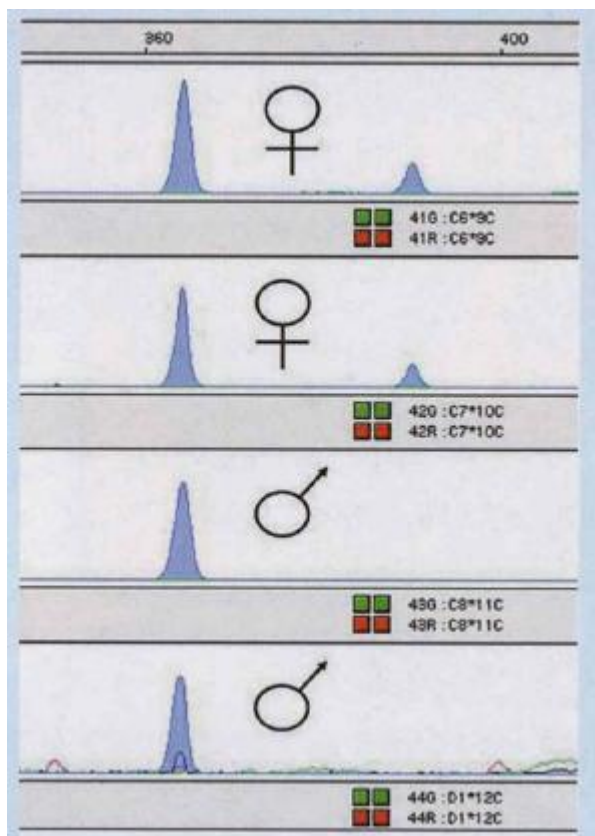
Mouse      CHD1  AAGAAACGTG GGCGACCCCG CACTATCCCT CGGGAGAATA TTAAAGGATT TAGTGATGCG GA
Chicken    CHD-W  ..A..... .A....A.. A....T..C ..T..A..C. ....A ..
Chicken    CHD-Z  ..A..G.... .AA....T.. A..C..T... ..A..A.... .....A ..
Zebra Finch CHD-W  ..A..... .AA....G.. A....T... ..A..A.... .....C....A ..
Zebra Finch CHD-Z  ..A..... .AA....A.. A....T... ..A..A.... .....A ..
Primer 2          TTTCCTAA ATCGCTACGT CT

```

Z obrázku 44 je patrné, že intron gonozómu Z je kratší oproti intronu gonozómu W. Tento výsledek byl potvrzen u všech ptačích druhů hodnocených v bakalářské práci.

Lze předpokládat, že komerční genetické laboratoře využívají rovněž automatické postupy založené na kapilární elektroforéze. Například Kučerová a Vodička (2009) ve své publikaci prezentovali následující obrázek.

Obrázek 45: Detekce pohlaví papuška aratingy slunečního – upraveno podle Kučerová a Vodička (2009)



Z obrázku 45 vyplývá, že komerční laboratoř Genexone, provádí identifikaci pohlaví rovněž s využitím kapilární elektroforézy. Z velikostí píků, lze předpokládat, že pro analýzu byl použit s velkou pravděpodobností shodný genetický marker, jako byl použit při řešení bakalářské práce. Lze předpokládat, že Kučerová a Vodička (2009) použili marker podle Griffiths et al. (2008), protože u samců ZZ je produktem amplifikace menší fragment oproti samicím ZW, u kterých byl detekován větší a menší amplikon.

7 Závěr

V bakalářské práci jsou shrnuty výsledky pilotních experimentů, které byly na Katedře genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze provedeny u modelových druhů ptáků. Bakalářská práce je zaměřená na studium identifikace pohlaví ptáků.

Výsledky získané při řešení bakalářské práce je možné shrnout do následujících bodů:

- Byly vybrány modelové druhy ptáků o celkovém rozsahu 18 druhů.
- Pro optimalizaci molekulárních markerů, kdy je zapotřebí poměrně velké množství DNA, byla s úspěchem použita DNA izolovaná z krční, srdeční, a žaludeční svaloviny a z jaterních buněk.
- Odběry rostoucích brků s krví se ukázaly jako vhodná neinvazivní metoda pro získání biologického materiálu určeného k izolaci genomické DNA. Tento způsob odběru biologického materiálu je možné doporučit chovatelům se zájmem o identifikaci pohlaví ptáků.
- Pro genetické analýzy lze použít s úspěchem i DNA izolovanou z krevní sraženiny ve vypadlém brku. Tato sraženina se však nemusí nacházet ve všech perech.
- Použitý izolační kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel) se ukázal jako vhodný pro extrakci genomické DNA. Výtěžnost DNA i parametry její kvality (elektroforetický test, poměry A260/A280 a A260/A230) prokázaly, že u všech vzorků byla získána vysoce čistá vysokomolekulární DNA.
- Byly optimalizovány dva molekulární markery vyhodnocující délku intronů genu CHD1, které souvisí se Z a W alelami tohoto genu.
- Pro rychlé laboratorní určení pohlaví doporučuji použít marker 2550F – 2718R podle Fridolfsson a Ellegren (1999). U tohoto markeru je možné identifikovat rozdíly mezi gonozómy Z a W při použití agarózové gelové elektroforézy.
- Pro identifikaci pohlaví je možné použít rovněž marker P2 – P8 podle Griffiths (1998). U tohoto markeru doporučuji použít pro identifikaci rozdílů mezi alelami kapilární elektroforézu.
- Při řešení bakalářské práce byly získány sekvence amplikonů markeru 2550F – 2718R dosud necharakterizovaných druhů ptáků. Jedná se o sekvence labutě velké, husy domácí, kachny domácí, křepelky čínské, hrdličky zahradní, ary ararauny, žaka šedého, papouška mnišího, agapornise různohrdlého a andulky vlnkované. Lze

předpokládat, že získané sekvence budou v blízké době uloženy v mezinárodní nukleotidové databázi NCBI.

- Získaná molekulární data byla vyhodnocena pomocí fylogramů, které jednoznačně prokázaly vztah mezi sekvencemi amplikonu 2550F – 2718R a taxonomickým zařazením studovaných druhů do čeledí. Tento výsledek platí pro molekulární hodnocení gonozómu Z a W.

8 Seznam použité literatury

- Abeele, van D. 2006. Agapornisové. Dona. České Budějovice. 303 s. ISBN: 8073220938.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing, s.r.o. Ústí nad Labem. 630 s. ISBN: 809020604.
- Alderton, D. 2002. Ptáci. Columbus. Praha. 118 s. ISBN: 8072491407.
- An, J., Lee, M. Y., Min, M. S., Lee, M. H., Lee, H. 2007. A molecular genetic approach for species identification of mammals and sex determination of birds in a forensic case of poaching from South Korea. *Forensics Sci. Int.* 167 (1). 59 – 61.
- Arnold, A.P.O.D., Melamed, E. 2007. A birds – eye view of sex chromosome dosage compensation. *Annu Rev Genomics Hum genet.* 9 (3). 109 – 127.
- Barske, La., Capel, B., 2008. Blurring the edges in vertebrate sex determination. *Curr Opin Genet Dev.* 18 (6). 499 – 505.
- Bartosch – Harlid, A., Berlin, S., Smith, N. G., Moller, A. P., Ellegren, H. 2003. Life history and the male station bias. *Evolution.* 57 (10). 2398 – 2406.
- Berlin, S., Brandstrom, M., Backstrom, N., Axelsson, E., Smith, N. G., Ellegren, H. 2006. Substitution rate heterogeneity and the male station bias. *J. Mol. Evol.* 62 (2). 226 – 233.
- BioLib – Mezinárodní encyklopedie rostlin, hub a živočichů. 1999 – 2013. [on-line]. [cit. 2013 – 04 - 03]. Dostupné z <<http://www.biolib.cz/>>.
- Bouchner, M., Procházka, P., 1997. Ptáci bez hranic. Granit. Praha. 158 s. ISBN: 808580560X.
- Brubaker, J. L., Karouna – Renier, N. K., Chen, Y., Jenko, K., Sprague, D. T., Henry, P. F. 2011. A noninvasive, direct real – time PCR method for sex determination in multiple avian species *Mol Ecol. Resour.* 11 (2). 415 – 417.
- Bureš, J., Zavadil, R. 1972. Příručka chovatele holubů. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 307 s. ISBN: 07-029-74

- Clinton, M., 1998. Sex determinativ and gonadal development: a bird's eye view. *J. Exp. Zool.* 281 (3). 457 – 465.
- Cortes, O., Barroso, A., Dunner, S. 1999. Avian sexing an optimized protokol using polymerase chain reaction – single strand conformation polymorphism. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11 (5). 297 – 299.
- Costantini, V., Garicci, A. C., Laricchiuta, P., Rausa, F., Lacalandra, G. M. 2008. DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples. *Anim. Reprod. Sci.* 106 (2). 162 – 167.
- Cramp, S., (ed.) 1983. *The Birds of the Western Palearctic. Vol. 3.* Oxford Univ. Press, Oxford. 306 s. ISBN: 0198575068
- Dienstbier, J. 1980. *Cizokrajní ptáci v klecích.* Státní nakladatelství. Praha. 157 s.
- Elbrecht, A., Smith, R. G. 1992. Aromatase enzyme aktivity and sex determinativ in chicken. *J. Exp. Zool.* 290 (5). 727 – 740.
- Ellegren, H. 1999. Sex determinativ in the avian model. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 263. 1635 - 1641.
- Fridolfsson, A. K., Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non – ratite birds. *Journal of Avian Biology.* 30 (1). 116 – 121.
- Fukui, E., Sugita, S., Yoshizawa, M. 2008. Molecular sexing of jungle crow (*Corvus macrorhynchos japonensis*) and carrion crow (*Corvus corone corone*) using a feather. *Animal Science Journal*, 79 (2), 158-162.
- Fukushima, Y., Mukoyama, H., Sato, F., Hasegava, T., Ishida, N., Muramatsu, S. 1999. Sex determinativ of equine static and germ cells by PCR amplification based on the semence polymorphism of X – and Y – chromosomal amelogenin genes. *Journal of Animal Science.* 70. J6 – J10.
- Garcia – Morena, J., Mindell, D. 2000. Rooting a phylogeny with homologous genes on opposite sex chromosomes (Gametologs) a case study using avian CHD. *Mol. Biol. Evol.* 17 (4). 1826 – 1832.
- Grahl, W. 1984. *Cizokrajní ptáci v klecích.* Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 208 s.

- Griffin, H. G., Griffin, A. M. 1994. PCR Technology – Current Innovations. PCR Press. London. p. 370. ISBN: 0-849-386748
- Griffiths, R., Daan, S., Dijkstra, C. 1996. Sex identification in birds using two CHD genes. Proc. R. Soc. London. B. 262 (2). 1251 – 1256.
- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., Dawson, J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology. 7 (8). 1071 – 1076.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Pifferre, F., Chang, C. F. 2009. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex chase in fish. Gen Comp Endocrinol. 165 (2). 352 – 366.
- Harrison, G. J. 1978. Endoscopic examination of avian gonadal tissue. Vet Med Small Anim Clin. 73 (2). 479 - 484.
- Harvey, M. G., Bonter, D. N., Stenzler, L. M., Lovette, I. J. 2006. A comparison of plucked feathers versus blood sample as DNA sources for molecular sexing. Journal of Field Ornithology. 77 (2). 136 - 140.
- Hudec, K. 1983. Ptáci. Academia. Praha. 123 s. ISBN: 21-127-83
- Hudson, Q. J., Smith, C. A., Sinclair, A. H. 2005. Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. Dev Dyn. 233 (2). 1052 - 1055.
- Huynen, L., Millar, C. D., Lambert, D. M. 2002. A DNA test to sex ratite birds. Molecular Ecology. 11 (4). 851-856.
- Chue, J., Smith, C., A. 2011. Sex determinative and sexual differentiation in the avian model. Journal. 278. 1027 – 1034.
- Ito, H., Sudo-Yamaji, A., Abe, M., Murase, T., Tsubota, T. 2003. Sex Identification by Alternative Polymerase Chain Reaction Methods in *Falconiformes*. Zoological Science. 20 (3). 339 - 344.
- Itoh, Y., Suzuki, M., Ogawa, A., Munechika, I., Murata, K., Mizuno, S. 2001. Identification of the sex of a wide range of Carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EEO. 6 and its related sequences. Journal of Heredity. 92 (4). 315 - 321.

- Jeanmougin, F., Thomson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. Gibson, T. J. 1998. Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends Biochem Sci.* 23. 403 – 405.
- Kašička, V. 1997. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy.* 91 (5). 320 – 329.
- Khan, N. W., St John, J., Quinn, T. W. 1998. Chromosome - specific intron size differences in the avian CHD gene provides an efficient method for sex identification in birds. *Auk* 155 (5). 1074 – 1078.
- Koo, G. C., Allen, H. I., Long, R. A., Serio – Dunn, R., Goggin, B., Weppelman, R. M. 1985. Effect of tamoxifen on H – Y antigen expression and gonadal development in chicken embryos. *Differentiation.* 29 (5). 140 – 144.
- Kooten, A. 2010. Papoušci. Dona. České Budějovice. 392 s. ISBN: 9708073221478.
- Kučerová, L., Vodička, R. 2009. Vetrinární poradna současné možnosti molekulárně – biologických metod determinace pohlaví u ptáků. *Nová exota. Horka nad Moravou.* (4) 34 – 35.
- Lemos, N. P., Bartolotti, F., Manetto, G., Anderson, R. A., Cittadini, F., Tagliaro, F. 2001. Capillary electrophoresis: a new tool in forensic medicine and science. *Science & Justice.* 41 (3). 203 - 210.
- Melamed, E., Arnold, A.P.O.D. 2007. Regional differences in dosage compensation on the chicken Z chromosome. *Genome Biol.* 8 (3). R202.
- Montell, H., Fridolfsson, A. K., Ellegren, H. 2001. Contrasting levels of nucleotide diversity on the avian Z and W sex chromosomes. *Mol. Biol. Evol.* 18 (11). 2010 – 2016.
- Mu - Yeong, L., Yoon - Jee, H., Sun - Kyung, P., Young - Jun, K., Tae -Young, C., Hang, L., Mi - Sook, M. 2008. Application of Two Complementary Molecular Sexing Methods for East Asian Bird Species. *Genes & Genomics.* 30 (4). 365 - 372.
- Nanda, I., Schlegelmilch, K., Haaf, T., Scharl, M., Schmid, M. 2008. Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families) supports a role for Z dosage in avian sex determination. *Cytogenet Genome.* 122 (8). 150 – 156.

- Peters, J. L., McCracken, K. G., Zhuravlev, Y. N., Lu, Y., Wilson, R. E., Johnson, K. P., Omland, K. E. 2005. Phylogenetics of wigeons and allit (*Anatidae: Anas*): The importace of sampling multiple loci and multiple individuals. *Mol. Phylogenet. Evol.* 35 (1). 209 – 224.
- Petříčková, J. 2002. Nejstarší nálezy kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*) v Čechách, na Moravě a Slovensku. *Archeologie ve středních Čechách.* 6 (2). 287 - 289.
- Raymond, C. S., Kettlewell, J. R., Hirsch, B., Bardwell, V. J., Zarkower, D. 1999. Expression of *Dmrt1* in the genitál ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol* 215 (5). 208 – 220.
- Robiller, F. 1980. *Astrildovité vtáky.* Příroda. 367 s. Bratislava.
- Saitoh, Y., Saitoh, H., Ohtomo, K., Mizuno, S. 1991. Occupancy of the majority of DNA in the chicken W chromosome by bent – repetitive sequences. *Chromosoma.* 101 (2). 32 – 40.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. F. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York. p. 545. ISBN: 0879693096.
- Smith, C. A. McClive, P. J. Western, P. S. Reed, K. J., Sinclair, A. H. 1999. Conservation of a sex – determining gene. *Nature.* 402 (5). 601 – 602.
- Smith, C. A. Roeszler, K. N., Hudson, Q. J., Sinclair, A. H. 2007. Avian sex determinativ: chat, hen and where? *Cytogenet Genome Res.* 117 (7). 165 – 173.
- Smith, C. A. Shoemaker, C. M. Roeszler, K. N. Queen, J. Crews, D., Sinclair, A. H. 2008. Cloning and expression of R – Spondin in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Dev Biol.* 8 (3). 72.
- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Ohnesorg, T., Cummins, D. M., Farlie, P. G., Doran, T. J., Sinclair, A. H. 2009. The avian Z – linked gene *DRMT1* is required for male sex determinativ in the chicken. *Nature.* 461 (3). 267 – 271.
- Snustad, D. P., Simmons, J. M. 2009. *Genetika.* Masarykova univerzita. Brno. 871 s. ISBN: 9788021048522.

- Stokes, D. G., Perry, R. P. 1995. DNA – binding and chromatin localization properties of CHD1. *Mol. Cell. Biol.* 15 (5). 2745 – 53.
- Suh, A., Kriegs, J. O., Brosius, J., Schmitz, J. 2011. Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution. *Mol. Biol. Evol.* 28 (11). 2993 – 2997.
- Sundstrom, H., Webster, M. T. Ellegren, H. 2003. Is the rate of insertion and deletion station male besed. Molecular evolutionary analysis of avian and primate sex chromosome sequences. *Genetis.* 164 (1). 259 – 268.
- Špaček, F., Burda, F. 1987. Atlas plemen hospodářských zvířat. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 259 s.
- Taylor, M. 1992. Endoscopy Laboratory Manual. Assoc Avian Vet. p. 1-10.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple semence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* 25. 4876 - 4882.
- Tokunaga, C., Lam, W. – J., Fastier, D., Aikman, H., Chan, C. – H., Chambers, G. K. 2007. Morphological sexing of Forbes paraket (*Cyanoramphus forbesi*) validated by molecular data. *Notornis.* 54 (9). 38 – 41.
- Tone, M., Saitoh, H., Ohtomo, K., Mizuno, S. 1982. Demonstration of W chromosome – specific repetitive DNA sequences in the domestic fowl. *Gallus g. Domestici Chromosoma.* 86 (1). 551 – 569.
- Turk, J. 2007. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science. *Vet. Anim. Sci.* 31 (6). 371 – 374.
- Ugaz, V. M., Christensen, J. L. 2007. Elektrophoresis in Microfluidic Systems. In: Hardt, S., Schönfeld, F., (eds.). *Microfluidic Technologies for Miniaturized Analysis Systems.* Springer Science + Bussines Media. LLC. New York. p. 393 - 438. ISBN: 9780387285979.
- Vašíček, M. 2001. Arové a ratingy. Barko. Kosmonosy. 279 s.
- Vašíček, M. 2004. Kakaduové a loriové. Barko. Kosmonosy. 230 s. ISBN: 8594048090083

- Veger, Z. 1988. Papoušci – opeření přátelé člověka. Akademia, nakladatelství Československé akademie věd. Praha. 284 s. ISBN: 8070330694
- Veger, Z., Kamínek, V. 1980. Kapesní atlas okrasných ptáků. Státní pedagogické nakladatelství. Praha. 235 s. ISBN: ISBN 8070330694
- Veger, Z., Šálek, J. 1971. Kapesní atlas cizokrajných ptáků. Státní pedagogické nakladatelství. Praha. 284 s.
- Verhoef – Verhallenová, E. J. 1999. Encyklopedie ptáků v klecích a voliérách. Rebo. Praha. 312 s. ISBN: 8072340700
- Verhoef, E. 2006. Ptáci v klecích a voliérách. Rebo. Dobřejovice. 312 s. ISBN: 8072346032.
- Zhao, D., MCBride, D., Nandi, S., McQueen, H. A., McGrew, M. J., Hocking, P. M., Lewis, P. D., Sang, H. M., Clinton, M. 2010. Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. *Nature*. p. 464. (13). 237 – 242.

9 Seznam použitých zkratek

A	Adenin
AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů
C	Cytosin
DNA	deoxiribonukleová kyselina
F-primer	přímý primer
G	Guanin
CHD	chromodomain-helicase-DNA-binding protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
R-primer	zpětný primer
T	Thymin
TBE	tris-borátový pufr (SAMBROOK et al., 1989)
TE	tris-EDTA pufr (SAMBROOK et al., 1989)
TRIS	tris[hydroxymetyl]aminometan
W	samičí gonozóm
Z	samčí gonozóm

Příloha 1: Fotodokumentace hodnocených druhů – autoři fotografií Benc a Vejl



Ara ararauna



Eklektus různobarvý



Andulka vlnkovaná



Kakadu růžový



Agapornis růžohrdlý



Křepelka čínská



Havran polní



Hrdlička zahradní



Holub hřivnáč



Kachna divoká



Labuť velká



Racek šedokřídlý



Žako šedý

Příloha 2: Složení pufrů použitelných pro gelovou elektroforézu

Vzorkový pufr (Sambrook et al., 1989)

- 0,25 % bromfenolové modři - sodná sůl (Serva, SRN)
- 0,25 % xylencyanolové modři FF (Sigma, USA)
- 15,0 % ficolu (Sigma, USA)
- vše rozpustit ve sterilní 2x deionizované H₂O
- uchovávat při 4°C

10xTBE pufr (Sambrook et al., 1989)

- 450 mM Tris-kyselina boritá (Sigma, USA), pH 8,0
- 10 mM EDTA (Sigma, USA)
- uchovávat při 4°C

1xTBE pufr (Sambrook et al., 1989)

- naředit 10xTBE pufr 1x deionizovanou H₂O
- uchovávat při 4°C

Zásobní roztok ethidium bromidu (Sambrook et al., 1989)

- 10 mg ethidium bromidu (Sigma, USA)
- 1 ml sterilní 2x deionizované H₂O
- při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných rukavicích
- uchovávat ve tmě při teplotě 4°C

Elektrodový pufr

- 1500 ml 1xTBE
- 75 μ l zásobního roztoku ethidium bromidu
- při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných rukavicích
- pufr je určen pro okamžité použití.

1x TE (Sambrook et al., 1989)

10 mM Tris (pH 8) (Sigma, USA)

1 mM EDTA (Sigma, USA)

pufr byl připravován jako 10x koncentrovaný zásobní roztok