

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**System molekulární determinace pohlaví
u volavek a jeho aplikace u dalších ptáků**

Diplomová práce

Bc. Martina Paprskářová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho odborné rady, ochotu, trpělivost a čas, které mi věnoval při psaní této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala svým kolegům z Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty UPOL za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Souhrn

Determinace pohlaví u ptáků je velmi důležitá pro studium ekologie, evoluční biologie, chovu a ochrany druhů. Až 50 % ptačích druhů je monomorfních a nelze rozeznat pohlaví dospělého jedince. V dnešní době je pohlaví u ptáků rozeznáváno na základě analýzy DNA.

V teoretické části této diplomové práce jsem se zabývala zpracováním informací o různých způsobech determinace pohlaví u ptáků, což bylo obsahem první kapitoly. Dále jsem se zaměřila na chromozomální determinaci pohlaví. Další kapitola je věnována jednotlivým metodám molekulární determinace pohlaví. Následně jsem popsala CHD gen a využití amplifikace tohoto genu při determinaci pohlaví u ptáků. V poslední kapitole teoretické části této diplomové práce se zabývám charakteristikou ptačích řádů, z nichž pocházejí testovaní jedinci.

V experimentální části jsem zjišťovala, zda kombinace primerů P8/WZ-common/W-specific, která byla navržena pro determinaci pohlaví u druhů z čeledi volavkovití, je použitelná pro determinaci pohlaví u jiných druhů. Jako kontrola determinace pohlaví byly použity primery P2/P8. Determinaci pohlaví jsem testovala u vybraných druhů, které patří do řádu brodiví (Ciconiiformes), veslonoží (Pelecaniformes), potápky (Podicipediformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), dlouhokřídlí (Charadriiformes), sovy (Strigiformes), dravci (Falconiformes) a pěvci (Passeriformes).

Celkově jsem testovala pohlaví u 35 ptačích druhů, z 15 čeledí a 8 řádů. Pomocí PCR amplifikace s primery P8/WZ-common/W-specific jsem identifikovala pohlaví u 33 ptačích druhů. U 2 druhů jsem získala protichůdné výsledky determinace pohlaví s primery P8/WZ-common/W-specific a s primery P2/P8. S těmito kontrolními primery P2/P8 nebylo možné určit pohlaví u 6 druhů.

Summary

Sex determination in birds is very important in studies of their ecology, evolutionary biology, breeding and species conservation. More than 50% of bird species is monomorphic and sex of adult is hard to distinguish. Nowadays, sex recognition in birds is based on DNA analysis.

In the theoretical part of this thesis I have dealt with processing information about the different ways of the sex determination in birds, which is content of the first chapter. I have also focused on chromosomal sex determination. Another chapter is devoted to the various methods of molecular sex determination. Then I have described CHD gene and the use of amplification of this gene in sex determination in birds. In the last chapter of the theoretical part of this thesis I have dealt with the characteristics of bird orders from which the test subjects.

In the experimental part, I have investigated if the combination of primers P8/WZ-common/W-specific that was design for the sex determination in species of the family Ardeidae can be used for the sex determination in other species. As a control for the sex determination have been used primers P2/P8. I have tested the determination of sex in some species belonging to the order of Ciconiiformes, Pelecaniformes, Podicipediformes, Phoenicopteriformes, Charadriiformes, Strigiformes, Falconiformes and Passeriformes.

Overall, I have determined the sex of 35 bird species from 15 families and 8 orders. Using PCR amplification with primers P8/WZ-common/W-specific I have identified the sex of 33 bird species. For 2 species I have obtained conflicting result of the sex determination with primers P8/WZ-common/W-specific and with primers P2/P8. With control primers P2/P8 it has not been possible to determine the sex of 6 species.

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce	9
3	Literární přehled	10
3.1	Determinace pohlaví u ptáků.....	10
3.2	Chromozomální determinace pohlaví u ptáků.....	12
3.3	Molekulární determinace pohlaví u ptáků.....	13
3.3.1	RFLP	14
3.3.2	RAPD	15
3.3.3	AFLP	15
3.3.4	ARMS.....	16
3.3.5	SSCP.....	17
3.4	Molekulární determinace pohlaví u ptáků založená na CHD genu	17
3.4.1	CHD gen.....	18
3.4.2	Determinace pohlaví u ptáků pomocí amplifikace genu CHD technikou PCR.....	19
3.4.2.1	Primery RGss1/RGss2	19
3.4.2.2	Primery P2/P3	20
3.4.2.3	Primery 1237L/1272H.....	21
3.4.2.4	Primery 2550F/2718R	22
3.4.2.5	Primery 3007F/2987F/3112R	23
3.4.2.6	Primery CH-F/CH-R	23
3.4.2.7	Primery P2/P8	24
3.4.2.8	Primery Sex1/Sex2	25
3.4.2.9	Primery P8/WZ-common/W-specific.....	26
3.5	Charakteristika testovaných řádů.....	27
3.5.1	Řád brodiví	29
3.5.2	Řád veslonozí.....	29
3.5.3	Řád potápky	30
3.5.4	Řád plameňáci.....	30
3.5.5	Řád dravci.....	31
3.5.6	Řád sovy	31
3.5.7	Řád dlouhokřídli	31

3.5.8	Řád pěvci	32
4	Materiál a metody	33
4.1	Biologický materiál	33
4.2	Izolace genomické DNA pro PCR z krve a tkání ptáků	33
4.3	PCR amplifikace DNA	34
4.4	Zpracování PCR produktů	38
4.5	Použité chemikálie	40
4.6	Použité roztoky	41
4.7	Laboratorní přístroje	44
5	Výsledky	45
6	Diskuze	79
7	Závěr	86
8	Seznam zkratk	87
9	Použitá literatura	88

1 Úvod

PCR amplifikace úseku CHD genu je univerzální metodou pro determinaci pohlaví u ptáků. CHD gen je konzervativní a je lokalizován na obou pohlavních chromozomech téměř u všech ptačích druhů. Determinace pohlaví je založena na tom, že primery nasedají na konzervativní části exonů a obvykle amplifikují intron. Velikost méně konzervativní intronové části se liší mezi CHD genem pocházejícím z chromozomu Z a W. Rozdíl ve velikosti je poté detekován při elektroforetické separaci. U samců je tedy přítomen jeden produkt amplifikace, zatímco samice mají produkty amplifikace dva. Na tomto principu je založena také amplifikace s primery P2/P8. Primery P8/WZ-common/W-specific také nasedají na konzervativní části CHD genu. Primer WZ-common nasedá na konzervativní část CHD genu chromozomu Z i W, tudíž produkt amplifikace primerů P8/WZ-common je přítomen u samců i samic. Primer W-specific nasedá na část CHD genu chromozomu W a produkt amplifikace s primery P8/W-specific je přítomen pouze u samic.

V této diplomové práci budu testovat determinaci pohlaví s primery P8/WZ-common/W-specific, které byly navrženy původně pro determinaci pohlaví u zástupců z čeledi volavkovití (Wang *et al.*, 2011). Pohlaví s těmito primery budu testovat u zástupců z čeledi volavkovití, dále u zástupců dalších dvou čeledí patřících také do řádu brodiví a dalších jedinců z 12 čeledí patřících do 7 dalších řádů. U testovaných jedinců bude pohlaví determinováno také pomocí amplifikace s primery P2/P8.

2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na tém diplomové práce.
3. PCR amplifikace DNA ptáků dostupných řádů za účelem otestování systému determinace pohlaví, který byl popsán u volavek (Wang *et al.*, 2011).

3 Literární přehled

3.1 Determinace pohlaví u ptáků

Jednou ze základních informací o každém jedinci je pohlaví. Ovšem poznat rozdíl mezi pohlavími u různých taxonomických druhů není vždy tak jednoduché jako např. u člověka (Dubiec *et* Zagalska-Neubauer, 2006). Určení pohlaví u ptáků dle fenotypu bývá obtížné. U poloviny ptačích druhů nelze rozeznat pohlaví dospělého jedince. Rozeznat pohlaví u ptačích mláďat je prakticky nemožné (Griffiths *et* Phil, 2000). Určení pohlaví u ptáků je důležité pro ekologii, evoluční biologii, chov a ochranu druhů (Fridolfsson *et* Ellegren, 1999).

U ptačích druhů, které jsou dimorfní, je velmi snadné rozeznat na první pohled samce a samice. Mezi tyto druhy patří např. vrabec domácí (*Passer domesticus*), kachna divoká (*Anas platyrhynchos*) nebo lejsk bělokrký (*Ficedula albicollis*) (Dubiec *et* Zagalska-Neubauer, 2006). Pohlaví jsou od sebe lehce rozeznatelná např. díky rozdílnému zbarvení peří či různé velikosti těla (Griffiths *et* Phil, 2000). U monomorfních druhů, které mají velmi podobný fenotyp, bývá problém pohlaví určit. Např. až 60 % všech druhů pěvců je monomorfních, co se týká zbarvení (Dubiec *et* Zagalska-Neubauer, 2006).

V dnešní době dochází k rozeznání pohlaví u ptáků na základě analýzy DNA (Griffiths *et* Phil, 2000). Dříve než došlo k aplikaci molekulárních metod, bylo pohlaví ptáků určováno jinými způsoby. Pozorování chování ptačích jedinců, či zjištění přítomnosti hnízdních nažin patří ke způsobům zjišťování pohlaví, které se mohou aplikovat pouze v období páření (Dubiec *et* Zagalska-Neubauer, 2006).

Další metodou je analýza morfometrických vlastností jedinců. Tato metoda ovšem může být dvojznačná a nepřesná (Dubiec *et* Zagalska-Neubauer, 2006). Kloskowski *et al.* (2006) se snažili stanovit pohlaví u potápky rudokrké (*Podiceps grisegena*) pomocí morfologie a následně tyto výsledky porovnat s výsledky určení pohlaví zjištěné analýzou DNA. Zvolená molekulární metoda byla nejprve použita u jedinců potápky rudokrké známého pohlaví, aby se zjistila úspěšnost identifikace pohlaví touto metodou. Pomocí molekulární metody bylo možné správně stanovit pohlaví u všech jedinců. Pohlaví jedinců bylo určeno např. tělesnou hmotností, délkou zobáku či délkou křídla. Při srovnávání výsledků, získaných biometrickým měřením

a analýzou DNA, se zjistilo, že pohlaví nelze přesně identifikovat pomocí morfologických vlastností. Např. při stanovení pohlaví změřením délky zobáku, byla úspěšnost identifikace 79 %. Při srovnání určení pohlaví pomocí analýzy DNA a určení pohlaví zjištěného změřením délky zobáku a délky křídla byla úspěšnost identifikace pohlaví biometrickým měřením 80 %.

K určování pohlaví ptáků se také využívá chirurgických zákroků. Při těchto metodách dochází k přímému zkoumání pohlavních žláz. To se provádí proto, že ptáci mají kloaku, která je u všech druhů, kromě labutí a kachen, monomorfní a tudíž nelze rozpoznat samce a samici. Existují dvě používané chirurgické techniky – laparotomie a laparoskopie. Jedinec je podroben lokální anestézii a následně je veden řez v břišní dutině mezi dvěma posledními žebry. Při laparotomii je takto vzniklý otvor dostatečně velký pro vložení kovové sondy, která posune střevní trakt, a tím umožní vyšetření pohlavních žláz. Ty jsou uloženy v těsné blízkosti páteře a leží těsně pod hrudním košem. Samec má pár varlat na rozdíl od samice, která má obvykle jeden vaječník. Ten je uložen na levé straně těla a pro snadnější kontrolu je tedy řez také veden na levé straně těla. U laparoskopie je provedena malá punkce do břišní dutiny a k vyšetření pohlavních žláz je použit optický kabel (Griffiths *et* Phil, 2000). Vyšetření pohlavních žláz u dospělých jedinců může být obtížné, pokud se provádí mimo období rozmnožování. U mláďat je toto vyšetření obtížné díky malé velikosti jejich těla (Dubiec *et* Zagalska-Neubauer, 2006).

Další metoda, kterou se dá určit pohlaví u ptáků, je cytogenetika. Identifikace pohlaví za pomoci cytogenetiky je založeno na rozdílné morfologii pohlavních chromozomů (Dubiec *et* Zagalska-Neubauer, 2006). Genom každého ptačího druhu je obsažen v určitém počtu chromozomů, např. dytlík velký (*Burhinus grallarius*) má 40 chromozomů a dudek chocholatý (*Upupa epops*) 126 chromozomů. Průměrný počet chromozomů se u ptačích druhů pohybuje okolo 80. Chromozomy se mohou dělit do dvou skupin. První skupinou jsou makrochromozomy, které jsou u ptáků přítomny v 7 až 8 párech a patří zde také pohlavní chromozom Z. Druhou skupinou jsou mikrochromozomy, které mají výrazně redukovanou velikost a do této skupiny se řadí i pohlavní chromozom W (Griffiths *et* Phil, 2000). U ptáků je systém pohlavních chromozomů oproti člověku opačný. Samice jsou heterogametické a mají jeden chromozom Z a jeden chromozom W. Samci jsou homogametičtí a mají dva chromozomy Z (Ellegren *et* Sheldon, 1997). Vyšetření chromozomů začíná založením buněčné kultury použitím dřeně rostoucího ptačího pera získanému po pelichání od

dospělců nebo od mláďat. Rostoucí buněčná kultura je poté smíchána s kolchicinem, který zastaví mitotické dělení ve stádiu metafáze, kdy jsou chromozomy dobře viditelné a oddělené. Chromozomy Z i W jsou od sebe dobře odlišitelné díky jejich různé velikosti. Ovšem velký počet chromozomů stěžuje identifikaci pohlavních chromozomů. Dnes už se určování pohlaví pomocí cytogenetiky používá jen zřídka (Griffiths *et Phil*, 2000; Dubiec *et Zagalska-Neubauer*, 2006). K určení pohlaví u ptáků lze využít také rozdílného množství jaderné DNA. Obsah DNA v buňkách je měřen pomocí průtokového cytometru. Tuto metodu lze použít pouze u ptačích druhů, jejichž pohlavní chromozomy Z a W se výrazně liší velikostí (Ellegren *et Sheldon*, 1997).

3.2 Chromozomální determinace pohlaví u ptáků

Stejně jako u spousty jiných živočichů, lze u ptáků rozlišit pohlaví na samčí a samičí. To je dáno díky chromozomální determinaci pohlaví. Determinace pohlaví u ptáků funguje prostřednictvím ZZ/ZW systému pohlavních chromozomů. Samice jsou heterogametické a mají jak chromozom Z, tak chromozom W. Samci jsou homogametičtí a mají dva chromozomy Z (Fridolfsson *et al.*, 1998; Ellegren, 2000; Nanda *et al.*, 2000; Stiglec *et al.*, 2007). Oba dva pohlavní chromozomy jsou metacentrické (Ellegren, 2000). Chromozom Z má u většiny ptačích druhů podobnou velikost. Bývá většinou čtvrtý nebo pátý největší a zaujímá 7 – 10 % genomu (Ellegren, 2000; Stiglec *et al.*, 2007). Oproti tomu W chromozom je u různých ptačích druhů různě velký. Např. u běžců je W chromozom prakticky stejně velký jako chromozom Z. U většiny ptačích druhů je ovšem W chromozom mnohem menší než Z a nese jen několik genů. Rozdíly ve velikosti W chromozomu mezi druhy jsou dány hlavně proměnlivým množstvím konstitutivního heterochromatinu. Např. W chromozom u kuřete představuje méně než 2 % genomu (Ellegren, 2000; Nanda *et al.*, 2000; Stiglec *et al.*, 2007).

Chromozomální determinace pohlaví je jedním ze způsobů determinace pohlaví nejen u ptáků, ale také např. u savců, kde funguje XX/XY systém pohlavních chromozomů, přičemž samice jsou homogametické (XX) a samci heterogametičtí (XY). Mechanismy pohlavní determinace u ptáků a savců se vyvinuly před více než 300 milióny lety. Došlo k procesu postupné diferenciaci pohlavních chromozomů z páru autozomů. Geny ATP5A1 a CHD1, které jsou lokalizovány na samičím

W chromozomu, mají svoji kopii na chromozomu Z. To ukazuje na společný původ obou pohlavních chromozomů z autozomu. Chromozomy Z a W obsahují některé homologní úseky. Místa homologie na Z chromozomu jsou vůči chromozomu W dvě. Jedno homologní místo se nachází blízko telomery na p rameni Z chromozomu a druhé se nachází na q rameni Z chromozomu. Na chromozomu W se obě dvě místa homologie nacházejí poblíž telomery na jednom konci chromozomu W (Fridolfsson *et al.*, 1998; Nanda *et al.*, 2000). Dříve se spekulovalo o tom, že pohlavní chromozomy savců a ptáků mají společný chromozomální původ (Ohno, 1967). Ovšem geny nacházející se na chromozomu Z kuřete mají své homology na lidských chromozomech 9, 5, 8 a 18. Geny mající své homology k savčímu chromozomu X jsou lokalizovány na chromozomech 1, 4 a 12 kuřete. Např. homolog genu DMRT1, který hraje klíčovou roli při určení pohlaví u ptáků a je přítomný na jejich Z chromozomu, je u savců lokalizován na chromozomu 9. To ukazuje na to, že evoluce pohlavních chromozomů u savců a ptáků nastala nezávisle na sobě z odlišných autozomálních párů (Fridolfsson *et al.*, 1998; Nanda *et al.*, 2000; Graves *et Shetty*, 2001; Ferguson-Smith, 2007; Stiglec *et al.*, 2007).

Vznik pohlavních chromozomů z autozomů je založen na získání vlastnosti pohlavní determinace jedním chromozomem, následuje potlačení rekombinace, strukturální přeskupení a degradace chromozomu nesoucího gen pro pohlavní determinaci. Klíčem tohoto procesu je nízký výskyt *crossing-overu* mezi chromozomy Z a W (Roldan *et Gomendio*, 1999).

3.3 Molekulární determinace pohlaví u ptáků

Pro molekulární určování pohlaví je zapotřebí DNA. Jeden ze způsobů získávání DNA od ptáků je pomocí odebrání krve. Ptačí erytrocyty obsahují jádro a jsou tedy zdrojem jaderné DNA. V závislosti na ptačím druhu a věku jedinců je krev odebírána buď z žíly na křídle nebo na noze. DNA je také možno získat sběrem peří nebo v případě uhynulých jedinců z tkání, především z mozku a jater (Dubiec *et Zagalska-Neubauer*, 2006). Pro molekulární determinaci pohlaví u ptáků lze využít několik technik.

3.3.1 RFLP

Pro určení pohlaví lze využít techniku RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů. Tato technika je založena na existenci specifického restričního místa, které je rozpoznáno restričními endonukleázami, štěpicími DNA v tomto místě. DNA je tedy štěpena pomocí restričních enzymů. Vzniklé fragmenty jsou poté elektroforeticky separovány dle velikosti. Jelikož restrikcí vzniká velké množství fragmentů, lze určitou specifickou sekvenci detekovat na základě hybridizace se značenou sondou. Po elektroforetické separaci tedy následuje přenos na nylonovou membránu (Southern blotting) a inkubace s próbami, což jsou značené DNA fragmenty. Próby hybridizují s genomickou DNA na základě komplementarity. Podle toho, zda byla próba značena pomocí radioizotopu, fluorescenční značkou nebo biotinem, dochází k detekci hybridizace autoradiografií, fluorescencí nebo enzymatickou reakcí. Pro získání pohlaví u ptáků je důležité zjistit přítomnost či nepřítomnost chromozomu W. Chromozom W obsahuje velké množství repetitivní DNA, mikrosatelitů a minisatelitů, které mohou být použity pro identifikaci tohoto chromozomu (Botstein, 1980; Ellegren *et Sheldon*, 1997; Griffiths *et Phil*, 2000; Dubiec *et Zagalska-Neubauer*, 2006). Příkladem je např. práce Longmire *et al.* (1993). Zde byly testovány 4 próby: tři dinukleotidové repetice (CT)_n, (GT)_n, (CG)_n a jedna trinukleotidová repetice (TCC)_n v kombinaci s jedním ze tří restričních enzymů: *HaeIII*, *HinfI* a *PstI* u devíti ptačích druhů ze šesti řádů. Z testovaných prób se jako nejlepší ukázala dinukleotidová repetice (CT)_n, která určila sekvenci specifickou pro samice u šesti ptačích druhů. Oproti tomu dinukleotidová repetice (CG)_n neidentifikovala žádnou sekvenci specifickou na pohlaví ani u jednoho z testovaných ptačích druhů. Techniku RFLP lze také použít při předchozí amplifikaci určitého genu pomocí PCR. Např. CHD gen je amplifikován pomocí PCR reakce a následně je štěpen pomocí restričního enzymu *HaeIII*. CHD gen je lokalizován na pohlavních chromozomech Z i W. Na chromozomu Z má tento gen restriční místo, které enzym *HaeIII* štěpí. Po použití tohoto enzymu vznikají fragmenty o velikosti 281 a 64 bp. Ovšem na chromozomu W toto restriční místo chybí a při použití enzymu *HaeIII* nedochází ke štěpení produktu CHD genu chromozomu W (Boutette, 2002).

3.3.2 RAPD

RAPD – polymorfismus náhodně amplifikované DNA je další technikou používanou pro určení pohlaví u ptáků. Tato technika identifikuje DNA polymorfismus bez předchozí znalosti genetické informace testovaného druhu. RAPD je založen na PCR reakci, která probíhá s náhodně sestavenými primery, které mají obvykle 10 nukleotidů. Reakce probíhá při nízké teplotě *annealingu*, obvykle 35 – 40 °C, která snižuje specifitu reakce. Amplifikuje se tedy mnoho DNA fragmentů. Fragменты jsou různě dlouhé a jsou následně rozděleny elektroforetickou separací. Pokud je nalezen band, který je přítomný pouze u samic, je pravděpodobné, že se jedná o amplifikovaný fragment z chromozomu W. Pro získání primerů, které amplifikují oblast na W chromozomu, je testováno velké množství primerů. Pokud se získá na pohlaví vázaný marker, mohou se vytvořit primery, které tento úsek amplifikují při standardní PCR (marker SCAR) (Williams *et al.*, 1990; Hadrys *et al.*, 1992; Griffiths *et al.*, 1993; Bello *et al.*, 1999; Dubiec *et al.*, 2006). Lessells *et al.* (1998) testovali pohlaví pomocí RAPD metody u deseti ptačích druhů. Primery určující pohlaví našli celkově u sedmi druhů. Počet primerů použitých na identifikaci pohlaví se pohyboval od 5 do 69. U zbývajících tří druhů nenašli autoři žádné primery, které by bylo možné použít pro identifikaci pohlaví a to i přes to, že u jednoho druhu testovali 67 primerů. To znamená, že i přes velký počet použitých primerů se při RAPD technice nemusí nalézt primery vhodné pro určování pohlaví. Spolehlivost nalezených RAPD markerů bývá ovšem zpochybnitelná. Je to dáno nastavením citlivosti reakce, překrytím méně amplifikované DNA silnějším produktem nebo existencí nulové alely, u které nedochází k amplifikaci.

3.3.3 AFLP

AFLP – polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů, je technika, která kombinuje PCR reakci se štěpením DNA pomocí restrikčních enzymů. Nejprve je DNA štěpena dvěma restrikčními endonukleázami. Jedna restrikční endonukleáza rozpoznává krátkou sekvenci (např. enzym *MseI* rozpoznává sekvenci TTAA). Druhá restrikční endonukleáza vyhledává delší sekvenci (např. enzym *EcoRI* rozpoznává sekvenci GAATTC) a tudíž štěpí DNA méně často. Následuje ligace oligonukleotidových adaptorů na konce fragmentů vytvořených endonukleázami. Dalším krokem

je preselektivní amplifikace s primery, které jsou komplementární k adaptorům a obsahují jeden nukleotid navíc. Tímto se sníží počet fragmentů. Následuje selektivní amplifikace s primery, které mají stejné pořadí nukleotidů jako primery u preselektivní amplifikace a jsou ještě prodlouženy obvykle o tři nukleotidy. Produkty jsou poté podrobeny elektroforetické separaci v polyakrylamidovém gelu. Výsledkem jsou tři typy markerů. Mnoho z nich je monomorfních a jsou společné pro všechny jedince. Druhý typ markerů jsou markery polymorfní, které jsou různé mezi jednotlivci, ovšem bez ohledu na pohlaví. Třetí typ markerů, který se dá touto technikou získat, jsou markery vázané na pohlaví. Tento typ markerů lze také použít k navržení primerů pro PCR (Griffiths *et Orr*, 1999; Zima *et al.*, 2004; Šmarda *et al.*, 2005; Dubiec *et Zagalska-Neubauer*, 2006).

3.3.4 ARMS

Amplifikaci nedostupný mutační systém (ARMS) je další možností zjištění ptačího pohlaví. ARMS technika je založena na tom, že oligonukleotidy, které jsou komplementární k dané sekvenci DNA s výjimkou nukleotidu na 3' konci, nejsou schopny fungovat jako primery při PCR reakci za určitých podmínek. Při zjištění mutace v určité sekvenci jsou navrženy ARMS primery pro danou oblast. ARMS primer, který je komplementární k mutované sekvenci, tedy na svém 3' konci nese nukleotid komplementární k mutaci, ARMS primer, který je komplementární k normální sekvenci a ARMS primer společný pro oba předchozí. Při PCR reakci jsou tedy použity tři primery (Little, 2001). Tato technika byla použita v práci Ito *et al.* (2003), při určení pohlaví u dravců. Autoři využili rozdílné sekvence v genu CHD na chromozomu Z a chromozomu W spočívající v bodové mutaci. Po proběhnutí PCR reakce s navrženými ARMS primery a následné elektroforetické separaci v agarózovém gelu rozpoznali pohlaví všech studovaných jedinců. U samců byl přítomný pouze jeden band, jelikož se amplifikoval CHD gen chromozomu Z. U samic se tento gen amplifikoval jak z chromozomu Z, tak z chromozomu W a na gelu byly přítomny dva bandy.

3.3.5 SSCP

Polymorfismus konformace jednovláknové DNA (SSCP) je založen na tom, že pohyblivost jednovláknové molekuly DNA v gelu za nenedenaturujících podmínek je vysoce závislá na její velikosti a struktuře. V roztoku získává jednovláknová molekula DNA prostorové uspořádání díky párování bází mezi nukleotidy. Tato konformace je závislá na délce vlákna, sekvenci a pozici a počtu spárovaných bází ve vláknech. Pokud dojde k bodové mutaci, změní se konformace molekuly a tato mutace může být tedy rozpoznána (Gasser *et al.*, 2007).

Metoda SSCP byla použita pro určení pohlaví u jestřába Cooperova (*Accipiter cooperii*). U tohoto druhu se pohlaví nejprve určovalo pomocí amplifikace CHD genu. Tento gen je lokalizován na pohlavních chromozomech, ovšem velikost tohoto genu je rozdílná na chromozomu W a chromozomu Z. Po amplifikaci genu CHD a následné elektroforetické separaci v agarózovém gelu se velikost produktu získaného z chromozomu Z lišila jen nepatrně od velikosti produktu získaného z chromozomu W. Pohlaví se tedy nedalo přesně určit. PCR produkty byly poté denaturovány a byla provedena elektroforetická separace produktů v polyakrylamidovém gelu za nenedenaturujících podmínek. Jelikož je u samce přítomný pouze chromozom Z, po vizualizaci PCR produktů na gelu bylo možné vidět dva bandy, každý představující jedno vlákno DNA. Samice mají chromozom Z i chromozom W, tudíž u nich byly přítomny bandy čtyři. Za použití SSCP metody se tedy dalo pohlaví spolehlivě určit (Ramos *et al.*, 2009).

3.4 Molekulární determinace pohlaví u ptáků založená na CHD genu

Jak již bylo výše popsáno, samci jsou homogametičtí a mají dva chromozomy Z. Oproti tomu samice jsou heterogametické a mají jeden chromozom Z a jeden chromozom W. Pro determinaci pohlaví u ptáků je tedy důležité zjistit přítomnost chromozomu W (Fridolfsson *et al.*, 1999). Pro zjištění přítomnosti W chromozomu bylo tedy nutné najít genetický marker, který by byl unikátní pro chromozom W. Griffiths *et al.* (1995) při snaze zjistit pohlaví u posledního volně žijícího jedince druhu ara Spixův (*Cyanopsitta spixii*) jako první objevili gen lokalizovaný na chromozomu W. Objev tohoto genu znamenal revoluci při určování pohlaví molekulárními technikami (Dubiec *et al.*, 2006).

Ellegren (1996) a Griffiths *et al.* (1996) nezávisle na sobě zjistili, že se jedná o CHD gen. Při svých výzkumech přišli na to, že se jedna kopie genu vyskytuje na chromozomu W a zároveň se druhá, velmi podobná kopie genu se nachází buď na autozomu nebo na chromozomu Z. Griffiths *et Korn* (1997) následně zjistili, že tato kopie genu je lokalizována na chromozomu Z.

3.4.1 CHD gen

Gen CHD (Chromo-Helicase/ATPase-DNA binding) kóduje protein, který má velký vliv na strukturu chromatinu, a tím se podílí na kontrole exprese genů (Griffiths *et Korn*, 1997). CHD gen obsahuje tři konzervativní sekvence (Stokes *et al.*, 1996).

Chromo (C) doména je svou sekvencí podobná proteinům HP1 a Polycomb (Griffiths *et Korn*, 1997). Tyto proteiny jsou zapojeny do potlačení genové exprese. Protein HP1 je převážně spojován s konstitutivním heterochromatinem (Stokes *et al.*, 1996). Proteiny Polycomb jsou inhibitory exprese homeotických genů a jsou odpovědné za zachování represivní struktury heterochromatinu (Woodage *et al.*, 1997).

Helikázová/ATPázová (H) doména CHD genu řadí produkty tohoto genu mezi velkou rodinu proteinů se širokou škálou biochemických funkcí jako je kontrola transkripce, rekombinace DNA, reparace DNA, translace a zpracování RNA. Helikázová/ATPázová doména je úzce příbuzná s rodinou proteinů SNF2. Studie prováděné na kvasinkách, octomilkách a savčích buňkách ukazují, že proteiny rodiny SNF2 fungují jako aktivátory transkripce (Stokes *et al.*, 1996). U octomilek hrají stejnou roli jako SNF2 proteiny také proteiny Brahma (Delmas *et al.*, 1993).

Třetí doménou CHD genu je DNA vazebná (D) doména. Tato doména se váže na DNA pomocí malého žlábků. K vazbě mezi DNA a D doménou CHD genu dochází přednostně v místech DNA bohatých na A/T (Stokes *et al.*, 1996).

3.4.2 Determinace pohlaví u ptáků pomocí amplifikace genu CHD technikou PCR

CHD gen se stal univerzálním markerem pro určování pohlaví u ptáků. Změny v evoluci tohoto genu byly velmi pomalé a CHD gen je tudíž zachován mezi různými druhy. Tento gen je lokalizován na obou pohlavních chromozomech u téměř všech druhů ptáků. Výjimku tvoří podtřída běžci (Paleognathae), kteří mají nediferenciované pohlavní chromozomy (Dubiec *et* Zagalska-Neubauer, 2006). Díky tomu, že je gen CHD tak konzervativní, lze použít pro určení pohlaví u podtřídy letci (Neognathae) jeden pár primerů. Tyto primery současně amplifikují úseky CHD genu na chromozomu W i chromozomu Z. Jelikož se chromozom Z vyskytuje u obou pohlaví, je gen CHD na chromozomu Z amplifikován vždy, což slouží jako důkaz správného provedení PCR reakce (Griffiths *et al.*, 1998). Griffiths *et al.* (1996) použili pár primerů, které amplifikovaly úsek CHD genu na obou pohlavních chromozomech. Produkty této amplifikace měly ovšem stejnou velikost. Pro rozeznání pohlaví tedy ještě navíc použili restriční enzym, který selektivně rozštěpil fragment CHD genu pocházejícího z chromozomu Z. Nyní se nejčastěji používá PCR reakce, u které není nutné použití restričního enzymu, což je rychlejší, levnější a jednodušší.

Při PCR reakci se využívají primery, které nasedají na různé konzervativní části exonů a amplifikují úsek, který obvykle obsahuje introny. Ty tvoří nekódující úseky CHD genu, jsou méně konzervativní a liší se velikostí mezi CHD geny pocházejícími z chromozomu Z a z chromozomu W. Rozdílnost ve velikosti produktů takto amplifikovaných CHD genů se projeví po elektroforetické separaci. U samců bude přítomen jeden band, představující amplifikovaný CHD gen chromozomu Z. Samice bude mít dva bandy, jeden značí amplifikovaný CHD gen chromozomu Z a druhý amplifikovaný CHD gen chromozomu W (Griffiths *et al.*, 1998; Kahn *et al.*, 1998; Fridolfsson *et* Ellegren, 1999).

3.4.2.1 Primery RGss1/RGss2

V době, kdy ještě nebyla známá lokalizace genu CHD na pohlavních chromozomech ptáků, byla snaha o určení ptačího pohlaví potvrzením přítomnosti W chromozomu. Griffiths *et al.* (1992) se snažili určit pohlaví u špačka obecného (*Sturnus vulgaris*) amplifikací repetitivního DNA elementu vázaného na W chromozom

pomocí PCR reakce. Pro testování byla použita DNA získaná od 10 samců a od 10 samic špačka obecného. Pro provedení PCR reakce byly navrženy dva, 23nukleotidové primery: RGss1 (5'-CTGTCCTGCCACTTCCCAGCACT-3') a RGss2 (5'-CGGTCGGGAGGTTTCAAGGAATG-3'). Tyto primery amplifikovaly úsek o velikosti 175 bp, který se vyskytoval u všech jedinců. Ovšem jen u 10 samic byl amplifikován ještě úsek o velikosti 800 bp. Výskyt kratšího fragmentu, který byl přítomný u všech jedinců bez ohledu na pohlaví, byl známkou úspěšné PCR reakce. U fylogeneticky vzdálenějších druhů, např. u kavky obecné (*Corvus monedula*) nebo u sýkory koňadry (*Parus major*), nedošlo k amplifikaci úseku specifického pro pohlaví při PCR reakci provedené s primery RGss1 a RGss2. Určit pohlaví pomocí těchto primerů je tedy možné pouze u jedinců z rodu špaček (*Sturnus*).

3.4.2.2 Primery P2/P3

Griffiths *et* Tiwari (1995) navrhli primery P2 (5'-CTGCATCGCTAAAT-CCTTT-3') a P3 (5'-AGATATTCCGGATCTGATAGTGA-3') pro amplifikaci úseku konzervativního genu lokalizovaného na W chromozomu. U druhu ara Spixův došlo k amplifikaci úseku o velikosti 104 bp jak u samců, tak u samic. Amplifikovaný gen byl přítomen na chromozomu W, ale také ještě na jiném chromozomu. V té době ještě autoři netušili, že se jedná o CHD gen, který je přítomen na chromozomech Z a W. Pouhou amplifikací tohoto genu pomocí těchto primerů nebylo možné určit pohlaví. Pomocí sekvenace autoři zjistili, že amplifikovaný úsek, pocházející z chromozomu W, obsahuje restrikční místo pro enzym *DdeI*, zatímco amplifikovaný úsek nepocházející z W chromozomu toto restrikční místo nemá. Po provedení PCR reakce s těmito primery, štěpení enzymem *DdeI* a následné elektroforetické separaci produktů mohli autoři pozorovat u samců jeden produkt o velikosti 104 bp, zatímco u samic byly přítomny produkty o velikosti 31, 73 a 104 bp.

Griffiths *et al.* (1996) použili primery P2 a P3 k určení pohlaví u dalších ptačích druhů napříč třídou ptáci (Aves). PCR reakcí s těmito primery získali autoři produkty o velikosti 110 bp. Jako restrikční enzym použili *HaeIII*, jehož restrikční místo se nachází na CHD genu nepocházejícího z chromozomu W. CHD genu lokalizovanému na chromozomu W toto restrikční místo chybí. Výsledkem elektroforetické separace byly u samců dva produkty o velikosti 45 a 65 bp, získané

štěpením enzymem *HaeIII*. U samic byly přítomny 3 produkty o velikosti 45, 65 a 110 bp.

Martín *et al.* (2000) použili PCR reakci s těmito primery k určení pohlaví u mládřat druhu drop velký (*Otis tarda*). Dospělí jedinci tohoto druhu jsou dimorfní a lze velmi snadno rozlišit samce od samice. Mládřata jsou ale monomorfní. Ve své práci srovnávali určení pohlaví pomocí molekulární metody a určení pohlaví srovnáním morfologických vlastností jedinců jako je délka ocasu a hmotnost. Určení pohlaví pomocí morfologických vlastností bylo úspěšné u 98,2 % jedinců. Úspěšnost určení pohlaví amplifikací genu CHD pomocí primerů P2/P3 a následným štěpením restriční enzymem *HaeIII* byla 100%. Správnost určení pohlaví byla potvrzena po pár týdnech, kdy už bylo možné testované jedince rozlišit díky dimorfismu.

U druhů berneška havajská (*Branta sandvicensis*) a lesňák havajský (*Myadestes obscurus*) se nepodařilo určit pohlaví pomocí amplifikace genu CHD s primery P2/P3 a štěpením restričním enzymem *HaeIII*. Jak u samců, tak i u samic se vyskytoval pouze PCR produkt o velikosti 110 bp. Sekvenováním se zjistilo, že v místě působení restričního enzymu *HaeIII* na CHD genu pocházejícího z chromozomu Z došlo k mutaci a tudíž ke ztrátě restričního místa (Jarvi *et Farias*, 2006).

3.4.2.3 Primery 1237L/1272H

Primery 1237L/1272H byly navrženy tak, aby nasedaly na vysoce konzervativní část genu CHD. Primer 1237L (5'-GAGAACTGTGCAAAACAG-3') nasedá na helikázové doméně a primer 1272H (5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3') na DNA vazebné doméně CHD genu. Úsek, který amplifikují tyto primery, obsahuje intron. Introny nejsou tolik konzervativní a liší se svou velikostí mezi pohlavními chromozomy mnoha druhů ptáků. Pomocí těchto primerů bylo zjišťováno pohlaví u několika ptačích druhů. Velikost amplifikovaného úseku se mezi studovanými druhy pohybovala od 210 do 285 bp. Při elektroforetické separaci na agarózovém gelu byl u mnoha druhů přítomen jeden band u samců a dva bandy u samic, které odpovídají amplifikaci CHD genu na chromozomu Z a chromozomu W s odlišnou velikostí intronu. U některých druhů ovšem nebylo možné z výsledku elektroforetické separace v agarózovém gelu rozlišit pohlaví. Bylo to dáno tím, že rozdíl mezi velikostí amplifikovaného místa CHD genu na W a Z chromozomu byl velmi malý nebo nebyl

žádný. U těchto druhů byla tedy dále využita technika polymorfizmu konformace jednovláknové DNA k úspěšnému určení pohlaví (Kahn *et al.*, 1998).

Jensen *et al.* (2003) určovali pohlaví u celkem 47 druhů ptáků pomocí tohoto páru primerů a primerů P2/P8. Oba dva páry primerů amplifikovaly stejný intron, i když primery P2/P8 nasedají na jiná místa genu CHD než primery 1237L/1272H. Jelikož jak pár primerů 1237L/1272H, tak pár primerů P2/P8 amplifikovaly stejný intron, je rozdíl velikosti amplifikovaných produktů pocházejících z chromozomu Z a z chromozomu W stejný. Ve srovnání s P2/P8 bylo u amplifikace s primery 1237L/1272H přítomno více nespecifických produktů.

3.4.2.4 Primery 2550F/2718R

Pro molekulární určení pohlaví u ptáků pomocí porovnání různé délky intronu CHD genu pocházejícího z chromozomu Z a chromozomu W byly navrženy primery 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') a 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAAG-TGCTTG-3'). Primery byly navrženy z cDNA sekvence CHD genu W i Z chromozomu. Tato cDNA sekvence byla získána od kura domácího (*Gallus domesticus*). Po amplifikaci genomické DNA kura domácího těmito primery, byl získán produkt delší, než byla původní cDNA sekvence. Produkt získaný amplifikací CHD genu chromozomu W měl velikost 450 bp a produkt CHD genu chromozomu Z měl velikost 600 bp. Tyto primery nasedají na konzervativní část genu a amplifikují úsek obsahující intron. Pomocí sekvenace bylo zjištěno, že tento 150bp rozdíl opravdu odpovídal rozdílné velikosti intronu. Celkově bylo pro analýzu pohlaví testováno 50 druhů ptáků. Velikost amplifikovaného úseku CHD genu chromozomu W se u druhů pohybovala mezi 400 až 450 bp a fragmenty genu CHD chromozomu Z měly velikost 600 až 650 bp. U samců se po provedení agarózové elektroforézy vyskytoval jeden produkt a samice měly dva produkty různé velikosti. U některých druhů se u samic přednostně amplifikoval kratší úsek CHD genu na chromozomu W a produkt amplifikace tohoto genu z chromozomu Z nebyl detekován. U samců ovšem k amplifikaci došlo a díky rozdílné velikosti amplifikovaných produktů samců a samic bylo možné rozeznat, o jaké pohlaví se jedná. U třech druhů pěvců (Passeriformes) nebylo možné rozeznat pohlaví. Pro tyto druhy byla použita trojice primerů 3007F/3112R/2987F, díky kterým bylo možné pohlaví identifikovat (Fridolfsson *et* Ellegren, 1999).

Jarvi *et* Farias (2006) při testování zjistili, že pár primerů 2550F/2718R je vhodný pro analýzu pohlaví u druhů hýl mexický (*Carpodacus mexicanus*), vrabec domácí, panenka muškátová (*Lonchura punctulata*), šatovník žlutokápý (*Loxioides bailleui*), timálie čínská (*Leiothrix lutea*), sojkovec drozdovitý (*Garrulax canorus*), lesňák havajský (*Myadestes obscurus*) a kruhočko japonské (*Zosterops japonicus*).

3.4.2.5 Primery 3007F/2987F/3112R

Tyto primery byly použity při studiu molekulární evoluce CHD genu na chromozomu Z a na chromozomu W. Při tomto studiu byly srovnávány sekvence CHD genu pocházejícího od druhu lejsek bělokrký (*Ficedula albicollis*), slavík modráček (*Luscinia svecica*), budníček větší (*Phylloscopus trochilus*) a budníček lesní (*Phylloscopus sibilatrix*). Pár primerů 3007F (5'-TACATACAGGCTCTACTCCT-3') a 3112R (5'-CCCCTTCAGGTTCTTTAAAA-3') byl použit pro amplifikaci intronu CHD genu chromozomu Z. Pro amplifikaci intronu CHD genu chromozomu W byly použity primery 3112R a 2987F (5'-CACTACAGGGAAACTGTAC-3') (Ellegren *et* Fridolfsson, 1997).

Seki (2003) studoval, zda úspěšnost analýzy pohlaví u červenky černohrdlé (*Erithacus komadori*) při použití DNA získané z bukální sliznice je stejná, jako když je DNA získána z krve. Pro zjištění pohlaví byly použity primery 3007F/3112R. Pohlaví u tohoto druhu bylo správně určeno, ať už byla zdrojem DNA krev nebo bukální sliznice. Odebrání vzorku buněk z bukální sliznice je méně invazivní a méně časově náročné než odebrání vzorku krve a je vhodné zejména pro určování pohlaví u mláďat.

3.4.2.6 Primery CH-F/CH-R

Primery CH-F (5'-GGATGAGGAACTGTGCAAAAC-3') a CH-R (5'-AATAGTTCGCGGTCTTCCAC-3') byly použity při identifikaci pohlaví u kanára divokého (*Serinus canaria*). Jelikož nebyla známa žádná sekvence CHD genu chromozomu W u kanárů, byla pro vytvoření těchto primerů použita sekvence CHD genu chromozomu W od druhu tangara olivovohřbetá (*Hemispingus frontalis*). Pomocí PCR amplifikace s těmito primery bylo možné určit pohlaví u kanára divokého. U samců byl po elektroforetické separaci PCR produktů na agarózovém gelu přítomen

produkt o velikosti 306 bp, zatímco u samic byl také přítomný produkt o velikosti 306 bp a poté ještě jeden větší produkt o velikosti 345 bp (Doosti *et al.*, 2009).

3.4.2.7 Primery P2/P8

Primer P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'), fungující jako *revers* primer, byl společně s primerem P3 navržen v práci Griffiths *et Tiwari* (1995). Tento pár primerů byl použit pro vyhledávání intronů v genu CHD. Sekvence CHD genu pocházejícího od myši domácí (*Mus musculus*) a sekvence CHD genu chromozomu Z od kura domácího byly použity pro vytvoření nového *forward* primeru P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'), kdy R = A/G a Y = T/C. Výsledkem porovnání dat získaných sekvenováním CHD genu u myši domácí, kura domácího a zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) bylo, že 3' konce primerů P2 a P8 jsou stejné u všech těchto druhů. Toto porovnání sekvence u taxonomicky vzdálených druhů ukázalo, že CHD gen je konzervativní a pár primerů P2/P8 amplifikuje část CHD genu u všech ptačích druhů. Pár primerů P2/P8 amplifikuje úsek CHD genu zahrnující intron, který není konzervativní a má rozdílnou velikost u CHD genu chromozomu Z a chromozomu W. Pro testování pohlaví pomocí primerů P2/P8 bylo použito celkem 28 ptačích druhů. Pohlaví bylo úspěšně určeno u 27 z nich. U samců se vyskytuje pouze jeden amplifikovaný produkt. U samic jsou přítomny dva amplifikované produkty. V mnoha případech byl produkt amplifikace CHD genu chromozomu W větší než produkt tohoto genu z chromozomu Z. Ovšem např. u holuba domácího (*Columba livia*) nebo vlhy pestré (*Merops apiaster*) tomu bylo přesně naopak. Velikost jednotlivých amplifikovaných úseků CHD genu se liší mezi různými ptačími druhy. Např. dva bandy vyskytující se po amplifikaci genu CHD u poštolky obecné (*Falco tinnunculus*) jsou větší než dva bandy u kavky obecné. U druhu puštík obecný (*Strix aluco*) se nepovedlo určit pohlaví pomocí elektroforetické separace PCR produktů v 3% agarózovém gelu, jak tomu bylo u ostatních druhů. Bylo to dáno tím, že velikosti intronu CHD genu chromozomu Z i W byly velmi podobné. Pro elektroforetickou separaci byl tedy použit 8% denaturující polyakrylamidový gel, díky němuž bylo možné rozeznat různé velikosti PCR produktů. Pomocí primerů P2/P8 nebylo možné určit pohlaví u druhu pštros dvourstý (*Struthio camelus*). Tento druh ovšem patří mezi běžce (Paleognathae), kteří nemají rozlišené pohlavní chromozomy (Griffiths *et al.*, 1998).

Primery P2/P8 byly použity pro určení pohlaví u druhů z řádů papoušci (Psittaciformes), šplhavci (Piciformes) a hrabaví (Galliformes). Elektroforetickou separací PCR produktů v agarózovém gelu bylo možné určit pohlaví u druhů řádu papoušci a šplhavci, které zastupovaly druhy z čeledi tukanovití. U druhů z čeledi hokovití (Cracidae), patřící do řádu hrabaví, bylo nutné použít elektroforetickou separaci v polyakrylamidovém gelu, jelikož PCR produkty CHD genu chromozomu Z a W měly podobnou velikost (Miyaki *et al.*, 1998).

Dawson *et al.* (2001) zjišťovali pohlaví jedinců u druhů alkounek drobný (*Aethia pygmaea*), alkounek nejmenší (*A. pusilla*), alkounek chocholatý (*A. cristatella*) a alkounek papouškovitý (*A. psittacula*) pomocí amplifikace CHD genu primery P2/P8. Při tomto testování byl zjištěn polymorfismus na chromozomu Z u všech studovaných druhů. Např. u většiny samců jedinců druhu alkounek drobný byl po elektroforetické separaci v polyakrylamidovém gelu přítomen jeden produkt o velikosti 377 bp. Ovšem u některých samčích jedinců byly přítomny dva produkty o velikosti 377 a 365 bp. U samic byl přítomen produkt PCR amplifikace o velikosti 391 bp, který představoval amplifikovaný úsek CHD genu chromozomu W. Úsek CHD genu chromozomu Z měl u většiny samic velikost 377 bp, ale u některých samic byla velikost 365 bp. Polymorfismus na Z genu byl také pozorován u druhu páv korunkatý (*Pavo cristatus*), sýkora koňadra a šoupálek dlouhoprstý (*Certhia familiaris*). Problémem amplifikace primery P2/P8 může být fakt, že PCR produkty pocházející z chromozomu Z jsou menší než ty, které pocházejí z chromozomu W. Úsek CHD genu na chromozomu Z může být amplifikován přednostně a může dojít k tomu, že samice je určena jako samec, což bylo pozorováno u tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*).

3.4.2.8 Primery Sex1/Sex2

Wang *et Zhang* (2009) použili tento pár primerů pro identifikaci pohlaví u bažanta mandžuského (*Crossoptilon mantchuricum*). Nejprve byla provedena PCR amplifikace s primery P2/P8 pro předběžné určení pohlaví. Produkty této amplifikace byly následně podrobeny sekvenaci. Primery sex1 (5'-TCCCAAGGATGAGAAA-CTGTGCAAACAGGTA-3') a sex2 (5'-CCTTCACTTCCATTAAGCTGATCTG-GAATTC-3') jsou komplementární ke konzervativní části osekvenovaného úseku CHD genu bažanta mandžuského. Úspěšnost identifikace pohlaví s těmito primery byla

100 %, zatímco úspěšnost určení pohlaví s primery P2/P8 byla 91,01 %. Primery Sex1/Sex2 úspěšně určily pohlaví také u ptačích druhů z řádu pěvci.

3.4.2.9 Primery P8/WZ-common/W-specific

Určování pohlaví pomocí amplifikace genu CHD primery P2/P8 nebylo u některých druhů úspěšné. U druhu volavka žlutozobá (*Egretta eulophotes*) nebylo možné určit pohlaví pomocí primerů P2/P8 díky polymorfizmu intronové části na CHD genu chromozomu Z. Byly tedy navrženy dva nové primery založené na konzervativním sekvenci části CHD genu amplifikovaného pomocí primerů P2/P8. Primer WZ-common (5'-CCCTTCACTTCCATTAAAGC-3') je lokalizován na konzervativním úseku CHD genu chromozomu Z i W. Primer W-specific (5'-ACCCAACCCAAAAGTACAAG-3') je lokalizován na specifické sekvenci genu CHD chromozomu W. PCR reakce byla provedena s celkově třemi primery. Jako *forward* primer byl použit primer P8 a jako *revers* primery byly použity primery WZ-common a W-specific. Produkty PCR amplifikace byly podrobeny elektroforetické separaci v 2% agarózovém gelu. U samic byly viditelné produkty o velikosti 250 bp, jenž je výsledkem amplifikace primerů P8/WZ-common a 140 bp, který amplifikoval pár primerů P8/W-specific. U samců byl přítomen pouze produkt o velikosti 250 bp. Testování těchto nových primerů nebylo prováděno pouze na druhu volavka žlutozobá, ale také u dalších druhů z čeledi volavkovití (Ardeidae) žijících v Číně. Jednalo se o druhy volavka stříbřitá (*Egretta garzetta*), volavka pobřežní (*E. sacra*), volavka bílá (*Ardea alba*), volavka popelavá (*A. cinerea*), volavka čínská (*Ardeola bacchus*), volavka rusohlavá (*Bubulcus ibis*), kvakoš noční (*Nycticorax nycticorax*), bukáček skořicový (*Ixobrychus cinnamomeus*) a bukáček žlutohý (*I. sinensis*). U všech těchto testovaných druhů bylo možné správně určit pohlaví pomocí amplifikace genu CHD primery P8/WZ-common/W-specific (Wang *et al.*, 2011).

3.5 Charakteristika testovaných řádů

Třidu ptáci (*Aves*) lze rozdělit na dvě podtřídy: běžce (*Paleognathae*) a letce (*Neognathae*). Letci se dále dělí na dva nadřády: *Galloanserae*, jenž obsahuje řády hrabaví a vrubozobí (*Anseriformes*) a *Neoaves*, což jsou všichni ostatní letci. Toto klasické pojetí systému je shodné při použití jak morfologických, tak molekulárních metod. Fylogenezi jednotlivých druhů lze zjišťovat na základě morfologie, DNA-DNA hybridizace, mitochondriálního genomu, různé délky intronu či ribozomální RNA. Výsledky fylogenetických studií pomocí těchto metod se ovšem liší a zjistit aktuální vztahy mezi jednotlivými skupinami je proto velmi obtížné (Hackett *et al.*, 2008).

Ericson *et al.* (2006) se pokusili o zjištění vztahů mezi *Neoaves* pomocí porovnání nukleotidové sekvence pěti jaderných genů od celkem 87 ptačích druhů. Použité geny byly *c-myc* (exon 3), RAG-1, myoglobin (intron 2), β -fibrinogen (intron 7) a ornithindekarboxyláza (introny 6 a 7). Ve své práci rozdělili nadřád *Neoaves* na *Metaves* a *Coronaves*. *Metaves* je monofyletickou skupinou, zahrnující např. čeleď holubovití (*Columbidae*), kolibříkovití (*Trochilidae*), lelkovití (*Caprimulgidae*), plameňákovití (*Phoenicopteridae*), potápkovití (*Podicipedidae*) a rorýsovití (*Apodidae*). Do skupiny *Coronaves* jsou zahrnuti pozemní, stromoví a vodní ptáci jako jsou např. čápovití (*Ciconiidae*), datlovití (*Picidae*), chřástalovití (*Rallidae*), jestřábovití (*Accipitridae*), pelikánovití (*Pelecanidae*), puštíkovití (*Strigidae*), sokolovití (*Falconidae*), tukanovití (*Rhamphastidae*). Toto rozdělení je ovšem závislé na přítomnosti intronu 7 genu pro β -fibrinogen při srovnávacích analýzách. Pokud je tento gen ze srovnání vyloučen, rozdělení ptáků na *Metaves* a *Coroaves* není tak jednoznačné. Při sestavování fylogenetických vztahů autoři také zjistili, že řády veslonozí i brodiví nejsou monofyletické. Do řádu veslonozí byly zařazeny čeledi pelikánovití, člunozobcovití (*Balaenicipitidae*), kladivoušovití (*Scopidae*), volavkovití a ibisovití (*Threskiornithidae*). Řád brodiví a veslonozí mají společného předka s řády tučňáci (*Sphenisciformes*) a potáplice (*Gaviiformes*).

Fylogenetické vztahy utvořené na základě mitochondriálního genomu od 41 ptačích druhů odmítají monofyletický původ druhů patřících do skupiny *Metaves*. Příkladem toho je, že sesterskou skupinou řádu plameňáci (*Phoenicopteriformes*) a potápky (*Podicipediformes*), patřící do *Metaves* je řád dlouhokřídli (*Charadriiformes*),

který patří do skupiny Coronaves. Vztahy mezi ptáky, které jsou vytvořeny dle mitochondriálního genomu ukazují, že čápi a volavky mají společného předka, který je ovšem jiný než společný předek fregatek a pelikánů. Na rozdíl od fylogenetických vztahů dělicích jednotlivé druhy na Metaves a Coronaves mají plameňáci a potápky dle srovnání mitochondriálního genomu poměrně blízko k řádu brodiví (Ciconiiformes) a veslonozí (Pelecaniformes) (Morgan-Richards *et al.*, 2008).

Hackett *et al.* (2008) testovali jadernou DNA z 19 nezávislých lokusů u 169 druhů ptáků. Autoři zjistili, že řád pěvci (Passeriformes) je spojen s několika morfologicky odlišnými řády jako jsou např. dravci (Falconiformes), papoušci, sovy (Strigiformes) a šplhavci. Podle výsledků své studie autoři vyloučili z řádu veslonozí čeled' faetonovití (Phaethontidae). Autoři ve své práci porovnali zařazení druhů do řádů podle třech různých klasifikací. Jestřábi a orli jsou v klasifikaci Peters *et al.* (1931 - 1987) a Livezey *et Zusi* (2007) zařazení do řádu dravci, ovšem dle klasifikace pocházející od Sibley *et Monroe* (1990) jsou součástí řádu brodiví. Rod plameňáci je dle Sibley *et Monroe* (1990) a Livezey *et Zusi* (2007) zařazen do řádu brodiví, ale dle Peters *et al.* (1931 - 1987) patří tento rod do řádu plameňáci. Stejně tak potápky jsou dle Sibley *et Monroe* (1990) zařazeny do řádu brodiví, ale podle klasifikace sestavené Peters *et al.* (1931 - 1987) a Livezey *et Zusi* (2007) patří čeled' potápkovití do vlastního řádu potápky. Jak plameňáci, tak potápky jsou dle výsledků studie Hackett *et al.* (2008) poměrně fylogeneticky vzdálené od řádu brodiví a tudíž nepatří do tohoto řádu. Rody pelikán, kormorán, terej a fregatka jsou podle Peters *et al.* (1931 - 1987) a Livezey *et Zusi* (2007) součástí řádu veslonozí, ovšem Sibley *et Monroe* (1990) je řadí do řádu brodiví. Do řádu brodiví se dle Sibley *et Monroe* (1990) řadí také rody čáp, člunozobec, ibis, kladivouš, volavka či tučňák. Podle Hackett *et al.* (2008) ovšem rody člunozobec, ibis, kladivouš a volavka mají blíže k pelikánům než k čápům a zástupci rodu tučňák tvoří vlastní řád tučňáci.

Členění ptačích druhů do jednotlivých řádů není tedy jednotné a je velmi problematické. Řád brodiví se dělí dle del Hoyo *et al.* (1992) a Šťastný *et al.* (1998a) na pět čeledí: čápkovití, člunozobcovití, ibisovití, kladivoušovité a volavkovité. Ovšem dle Gaisler *et Zima* (2007) a Burnie (2008) do řádu brodiví patří pouze tři čeledi: čápkovití, ibisovití a volavkovité. Čeled' člunozobcovité a kladivoušovité tito autoři přiřazují do řádu veslonozí. Řád dravci je dle Burnie (2008) rozdělen na tři čeledi – jestřábovití, kondorovití (Cathartidae) a sokolovití. Gaisler *et Zima* (2007) rozdělují řád dravci na pět čeledí, který kromě výše zmiňovaných čeledí obsahuje ještě čeled'

hadilovovití (Sagittariidae) a orlovcovití (Pandionidae), které jsou dle Burnie (2008) součástí čeledi jestřábovití.

3.5.1 Řád brodiví

Do řádu brodiví patří střední až velké druhy ptáků. Mezi nejmenší druhy patří bukáčci, kteří jsou vysokí 25 cm, zatímco největší jsou čápi, kteří mají velikost 1,5 m. Typickými znaky zástupců tohoto řádu jsou dlouhé nohy, dlouhý krk a dlouhý zobák. Všichni zástupci tohoto řádu jsou masožraví. Loví obvykle ryby, žáby a jiné obojživelníky nebo chytají hmyz ve vodě. Některé druhy požívají malé ptáky a jiní jsou mrchožraví. Způsob lovu je různý. Zástupci rodů volavka a bukáček hledají kořist zrakem, kdy zůstávají bez pohnutí na místě, dokud se kořist nepřiblíží. Jiní (ibisi a kolpíci) loví pomocí svého citlivého zobáku v bahnitě vodě. Čápi kráčeji pomalu trávou nebo bažinou a loví živočichy, které vyrušili. Zbarvení obou pohlaví je obvykle stejné nebo jen málo odlišné. Všechny druhy výborně létají. Mají široká křídla, která jim umožňují dokonalé statické plachtění. Některé druhy žijí po celý rok individuálně, většina druhů ovšem hnízdí ve skupinách. Hnízdí obvykle na stromech nebo v rákosinách. Hlasové projevy jsou velmi hlasité. Některé druhy hlasitě klapají zobákem. Mláďata jsou nidikolní a starají se o ně oba rodiče (Šťastný *et al.*, 1998a; Gaisler *et Zima*, 2007; Burnie, 2008).

Řád brodiví je rozdělen na tři čeledi: čápoovití, ibisovití a volavkovití. V řádu brodiví je celkem 115 druhů (Burnie, 2008). Dle původní klasifikace je tento řád rozdělen na pět čeledí: čápoovití, člunozobcovití, ibisovití, kladivoušovití a volavkovití.

3.5.2 Řád veslonozí

Řád veslonozí tvoří vodní ptáci, kteří mají všechny čtyři prsty spojené plovací blánou. Všichni jedinci tohoto řádu jsou rybožraví. Pro lov ryb používají různé techniky jako potápění, střemhlavý pád do vody, natlačování ryb na mělčiny a sbírání z vodní hladiny, sbírání z hladiny za letu nebo paraziticky od jiných ptáků. Mají mohutný, hluboce rozeklaný zobák a větší či menší hrdelní vak. Jsou to výborní letci, ale na souši se pohybují s obtížemi. Kostra je většinou pneumatizovaná. Obvykle hnízdí v koloniích na stromech či na zemi. Mláďata jsou nidikolní a jsou dlouho závislá na rodičích (Šťastný *et al.*, 1998a; Gaisler *et Zima*, 2007; Burnie, 2008).

Do tohoto řádu patří celkem osm čeledí a 64 druhů (Burnie, 2008). Čeleď kladivoušovití bývá v jiných klasifikacích zařazována do řádu brodiví. Pro determinaci pohlaví byly použity druhy z čeledi kladivoušovití, kormoránovití a pelikánovití.

3.5.3 Řád potápky

Do řádu potápky patří středně velcí vodní ptáci. Tělo je adaptováno k plavání a potápění. Krk je delší, křídla jsou krátká a úzká. Typickým znakem je, že každý prst je vrouben širokým ploutevním lemem. Nohy jsou posazené dozadu, což způsobuje to, že se po souši pohybují obtížně. Potravou jsou ryby, pulci, žáby, hmyz, měkkýši, raci, krabi atd. Létají rychle a na dlouhé vzdálenosti. Při vzletu potřebují dlouhý rozběh na hladině. Námluvy jsou velmi okázalé, spojené s hlasovými projevy, předáváním darů a prudkým šlapáním vody. Po navázání pouta mezi partnery dochází k vybudování plovoucího hnízda z rostlin. Mláďata jsou polokrmivá a starají se o ně oba rodiče, kteří své potomky vozí na zádech (Šťastný *et al.*, 1998a; Gaisler *et Zima*, 2007; Burnie, 2008).

Do řádu potápky patří jediná čeleď potápkovití, která obsahuje 22 druhů (Burnie, 2008).

3.5.4 Řád plameňáci

Vzhled jedinců, patřících do řádu plameňáci, je velmi nápadný. Mají dlouhé nohy, křídla a velmi dlouhý krk. Přední tři prsty jsou spojeny plovací blánou, palec je redukovaný. Mají silný, lomený zobák, který je opatřen lamelami. Potravu přijímají tak, že stojí ve vodě s hlavou skloněnou, zobák je horní polovinou orientován dolů, nasávají vodu a filtrují potravu (měkkýše, korýše, řasy atd.). Jsou to výborní letci. Barva peří je bílá, růžová až krvavá. Jsou monogamní a páry spolu zůstávají po celý život. Hnízdí v koloniích a staví si kuželovité hnízdo z bahna. Mláďata jsou nidikolní a starají se o ně oba rodiče (Šťastný *et al.*, 1998a; Gaisler *et Zima*, 2007; Burnie, 2008).

Do tohoto řádu patří pouze jedna čeleď plameňákovití, obsahující 6 druhů (Burnie, 2008).

3.5.5 Řád dravci

Mezi dravce patří ptáci různé velikosti. Mají silné, často opeřené nohy, s velmi dlouhými a ostrými drápy. Mají silný, zahnutý zobák, často s ostrou špicí na horní čelisti a silný svalnatý jazyk. Mají vynikající zrak a jejich oči směřují dopředu. Jsou to výborní letci. Loví většinou živočišnou potravu, někteří jsou mrchožraví. Samice bývá obvykle větší než samec. Hnízdí na stromech, skalách nebo na zemi. Jedno hnízdo používají po mnoho let. Mláďata se líhnou postupně, jsou nidikolní a starají se o ně oba rodiče. Při nedostatku potravy může být mladší mládě sežráno starším (Šťastný *et al.*, 1998a; Gaisler *et Zima*, 2007; Burnie, 2008).

Do řádu dravci patří 3 čeledi: kondorovití, sokolovití a jestřábovití. Řád dravci má celkově 304 druhů (Burnie, 2008).

3.5.6 Řád sovy

Sovy patří mezi noční ptáky. Jejich typickými znaky jsou vzpřímený postoj těla a velké oči směřující dopředu. Mohutný zobák mají od kořene zahnutý. Mají velmi dobrý sluch a výrazný hlas. Potravu loví za soumraku nebo v noci. Živí se převážně obratlovci jako jsou hlodavci či ptáci. Létají velmi tiše. Hnízdí na stromech, v dutinách, na skalách nebo v budovách, často využívají cizí hnízda. O mláďata, která jsou krmivá, se starají oba rodiče. Mláďata se líhnou postupně a při nedostatku potravy se stává, že starší mládě sežere mladší (Šťastný *et al.*, 1998b; Gaisler *et Zima*, 2007; Burnie, 2008).

Do řádu sovy patří 2 čeledi: sovovití (Tytonidae) a puštíkovití. Do řádu sovy patří 194 druhů (Burnie, 2008).

3.5.7 Řád dlouhokřídlí

Zástupci řádu dlouhokřídlí jsou velmi rozdílní tvarem a velikostí těla. Jedná se převážně o druhy žijící u vody. Jejich nohy jsou buď brodivé s krátkým nebo chybějícím zadním prstem, mohou mít nohy s dlouhými prsty a drápy nebo může být jejich noha plovací s laločnatou plovací blánou. Tvar zobáku je různorodý podle způsobu lovu potravy. U většiny druhů dochází ke střídání zimního a svatebního šatu. Jedinci tohoto druhu žijí jak u mořského pobřeží, tak i u sladkých vod. Potravou těchto ptáků jsou obvykle ryby. Většinou si nestavějí hnízda a kladou vejce rovnou na skalnaté

římasy nebo na zem. Hnízdí buď jednotlivě nebo v koloniích. Mláďata jsou obvykle nekrmivá či polokrmivá (Šťastný *et al.*, 1998b; Gaisler *et Zima*, 2007; Burnie, 2008).

Do tohoto řádu patří 16 čeledí a celkem 344 druhů (Burnie, 2008). Pohlaví bylo testováno u jedinců z čeledi kulíkovití (Charadriidae).

3.5.8 Řád pěvci

Do řádu pěvci patří druhy velmi rozmanitého vzhledu, malé až střední velikosti. Noha je tvořena čtyřmi prsty, kdy tři směřují dopředu a jeden dozadu. Mají krátká a široká křídla. Zobáky mají rozmanitě tvarované, podle toho, jakou potravou se živí. Zbarvení jedinců je také různé. Některé druhy jsou nenápadně zbarvené, jiné mají zase peří zbarvené velmi nápadně. Pěvci jsou nejčastěji hmyzožraví, semenožraví, všežraví, plodožraví nebo se živí nektarem a pylem. Všichni pěvci si stavějí hnízdo nejčastěji na stromech a keřích. Hnízdí ovšem také i v rozmanitých dutinách, na zemi, v rákosí, na skalách nebo na budovách. Jsou obratní letci a lehce se proplétají mezi vegetací. Pěvci vyluzují různé hlasy a většina i zpěv, který je pro každý druh typický melodičností, složitostí a délkou. Zpívat začíná mnoho pěvců v době rozmnožování. Mezi pěvci se vyskytují monogamické i polygamické druhy. Mláďata se líhnou holá a slepá. Jsou extrémně krmivá a charakteristicky loudí potravu po rodičích (Šťastný *et al.*, 1999; Gaisler *et Zima*, 2007; Burnie, 2008).

Řád pěvci obsahuje 92 čeledí. V řádu pěvci je více než 5200 druhů (Burnie, 2008). Pro determinaci pohlaví byly použity druhy z čeledi lejskovití (Muscicapidae), vrabcovití (Passeridae), budníčkovití (Phylloscopidae) a drozdovití (Turdidae).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro testování pohlaví u ptáků byli využiti jedinci pocházející jak z volné přírody, tak ze zoologických zahrad. Genomická DNA byla získána převážně izolací z krve. Pouze u jedinců druhu kormorán velký byla DNA získána izolací z kůže a svalů a u druhu potápka roháč byla DNA získána izolací ze svalů.

4.2 Izolace genomické DNA pro PCR z krve a tkání ptáků

Tento postup je převzatý podle Maniatis *et al.* (1982) a je upraven pro materiální a technické podmínky Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty UPOL.

- 1) Do mikrozkušavky bylo napipetováno 400 μ l roztoku krve v Queen's pufru. Při izolaci DNA z tkáně, byl do mikrozkušavky vložen kousek tkáně. Ten byl mikrohomogenizátorem zhomogenizován a následně bylo přidáno 400 μ l Queen's pufru.
- 2) Poté bylo připipetováno 100 μ l roztoku proteinázy K (10 mg/ml), překlápěním promícháno a připipetováno 100 μ l 10% roztoku SDS.
- 3) Mikrozkušavky byly přes noc inkubovány za překlápění v termostatu při 37 °C.
- 4) Do směsi bylo dále přidáno 350 μ l fenolu a 350 μ l chloroformu. Mikrozkušavky byly poté zvortexovány a zcentrifugovány (2 000 g / 2 min). Pomocí ustřížené špičky byla odebrána vrchní fáze do nové mikrozkušavky.
- 5) K odebranému roztoku bylo přidáno 700 μ l chloroformu. Tato směs byla zvortexována a zcentrifugována (2 000 g / 2 min). Poté byla ustříženou špičkou odebrána vrchní fáze do nové mikrozkušavky a tento krok byl ještě jednou zopakován.
- 6) K odebranému roztoku bylo přidáno 180 μ l vychlazeného octanu sodného o koncentraci 3 mol/l. Dále byly mikrozkušavky vyplněny vychlazeným 96% ethanolem, pomocí překlápění promíchány a uloženy na 2 hodiny do -20 °C.
- 7) Mikrozkušavky byly centrifugovány 30 minut při 13 000 g.

- 8) Ethanol byl opatrně slit a ke sraženině DNA byl napipetován 1 ml vychlazeného 70 % ethanolu.
- 9) Mikrozkušavky byly centrifugovány 10 minut při 13 000 g.
- 10) Ethanol byl opatrně slit a mikrozkušavky, které obsahovaly sraženinu DNA, byly vysušeny v termobloku.
- 11) K takto vysušené DNA bylo přidáno 500 μ l TE pufru.
- 12) DNA se poté rozpouštěla přes noc překlápěním v termostatu při 40 °C.
- 13) Po fluorometrickém stanovení koncentrace byla mikrozkušavka s roztokem DNA zmrazena v -20 °C. Pro použití DNA na PCR reakci, byla před zmražením část roztoku DNA odebrána a naředěna deionizovanou vodou na koncentraci 10 – 50 μ g/ml a uchována v lednici.

4.3 PCR amplifikace DNA

Genomická DNA byla použita pro determinaci pohlaví u ptáků amplifikací úseku CHD genu. Úsek CHD genu, obsahující intron, byl amplifikován pomocí dvou různých kombinací primerů. Jedna amplifikace tohoto genu proběhla pomocí dvojice primerů P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') a P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'). Pro druhý typ amplifikace byly využity primery P8, WZ-common (5'-CCTTCACTTCCATTAAAGC-3') a W-specific (5'-ACCCAACCCAAAAGTACAAG-3'). Primery byly obsaženy v PCR mixu, jehož složení je uvedeno v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Složení PCR mixu pro 6 vzorků.

Složky PCR mixu	Objem (μl)	
	Amplifikace s primery P2/P8	Amplifikace s primery P8/WZ-common/W-specific
Deionizovaná voda	44,4	41,1
Reaction Buffer 10 x	6,7	6,7
MgCl ₂ (25 mmol/l)	4,0	4,0
dNTPs (20 μmol/l)	0,7	0,7
primer P2 (10 μmol/l)	3,3	—
primer P8 (10 μmol/l)	3,3	3,3
primer WZ-common (10 μmol/l)	—	3,3
primer W-specific (10 μmol/l)	—	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U/μl)	1,0	1,0

Složky PCR mixu byly po rozmražení zvortexovány a zcentrifugovány. Poté byly jednotlivé složky napipetovány do 1,5 ml mikrozkušavek, zvortexovány a zcentrifugovány.

Do PCR zkumavek byl napipetován 1 μl genomické DNA o koncentraci 10 – 50 μg/ml. Genomická DNA pocházela od ptačích druhů uvedených v tabulce č. 2. Do každé PCR zkumavky s genomickou DNA bylo připipetováno 9 μl PCR mixu. PCR zkumavky byly zcentrifugovány a vloženy do termocykléru. Časový a teplotní profil PCR reakce byl následující:

5 min.....	94 °C	} 35 x
30 s.....	94 °C	
30 s.....	teplota <i>annealingu</i>	
30 s.....	72 °C	
7 min.....	72 °C	

Základní teplota *annealingu* byla 50 °C. Pro každý testovaný druh byla poté teplota *annealingu* optimalizována.

Tabulka č. 2: Přehled testovaných druhů, jejichž DNA byla použita pro determinaci pohlaví. V tabulce je dále uvedeno zařazení do čeledi a řádu.

Řád	Čeď	Druh
Brodiví (Ciconiiformes)	Čápvití (Ciconiidae)	Čáp černý (<i>Ciconia nigra</i>)
		Čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)
		Čáp simbil (<i>Ciconia abdimii</i>)
		Čáp sedlatý (<i>Ephippiorhynchus senegalensis</i>)
		Marabu africký (<i>Leptoptilos crumeniferus</i>)
		Nesyt bílý (<i>Mycteria cinerea</i>)
		Nesyt africký (<i>Mycteria ibis</i>)
		Nesyt indický (<i>Mycteria leucocephala</i>)
	Volavkovití (Ardeidae)	Volavka červená (<i>Ardea purpurea</i>)
		Volavka rusohlavá (<i>Bulbucus ibis</i>)
		Volavčík člunozobý (<i>Cochlearius cochlearius</i>)
	Ibisovití (Threskiornithidae)	Ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)
		Kolpík růžový (<i>Platalea ajaja</i>)
		Kolpík africký (<i>Platalea alba</i>)
	Veslonoží (Pelecaniformes)	Pelikánovití (Pelecanidae)
Pelikán skvrnozobý (<i>Pelecanus philippensis</i>)		
Pelikán africký (<i>Pelecanus rufescens</i>)		
Pelikán kadeřavý (<i>Pelecanus crispus</i>)		
Kladivoušovití (Scopidae)		Kladivouš africký (<i>Scopus umbretta</i>)
Kormoránovití (Phalacrocoracidae)		Kormorán velký (<i>Phalacrocorax carbo</i>)
Potápky (Podicipediformes)	Potápkovití (Podicipedidae)	Potápka roháč (<i>Podiceps cristatus</i>)

Tabulka č. 2: Pokračování.

Řád	Čeleď	Druh
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňákovití (Phoenicopteridae)	Plameňák růžový (<i>Phoenicopus roseus</i>)
		Plameňák karibský (<i>Phoenicopus ruber</i>)
Dlouhokřídlí (Charadriiformes)	Kulíkovití (Charadriidae)	Čejka chocholátá (<i>Vanellus vanellus</i>)
Sovy (Strigiformes)	Puštíkovití (Strigidae)	Kalous ušatý (<i>Asio otus</i>)
		Kalous pustovka (<i>Asio flammeus</i>)
Dravci (Falconiformes)	Jestřábovití (Accipitridae)	Káně lesní (<i>Buteo buteo</i>)
Pěvci (Passeriformes)	Lejskovití (Muscicapidae)	Lejsek černohlavý (<i>Ficedula hypoleuca</i>)
		Rehek domácí (<i>Phoenicurus ochruros</i>)
		Rehek zahradní (<i>Phoenicurus phoenicurus</i>)
		Červenka obecná (<i>Erithacus rubecula</i>)
	Drozdovití (Turdidae)	Drozd zpěvný (<i>Turdus philomelos</i>)
		Kos černý (<i>Turdus merula</i>)
	Vrabcovití (Passeridae)	Vrabc polní (<i>Passer montanus</i>)
	Budníčkovití (Phylloscopidae)	Budníček menší (<i>Phylloscopus collybita</i>)

4.4 Zpracování PCR produktů

Následující postup je optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biomera s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

- 1) Velké sklo bylo vydrhnuto kartáčkem, opláchnuto deionizovanou vodou a osušeno. Plocha skla na straně gelu byla dvakrát opláchnuta 96% ethanolem. Poté byl na sklo nanesen přípravek pro odpuzování vody ze skel automobilů, který se nechal 5 minut zaschnout. Po této době bylo sklo omyto deionizovanou vodou a osušeno papírovým ručníkem.
- 2) Malé sklo bylo důkladně omyto vodou se saponátem a vydrhnuto. Sklo bylo poté osušeno a plocha, která se měla dotýkat gelu, byla dvakrát opláchnuta 96% ethanolem. Na tuto plochu bylo nanášeno molekulární lepidlo, které se nechalo 5 minut zaschnout. Následovalo čtyřikrát omytí 96% ethanolem.
- 3) Na polystyrenovou podložku v digestoři bylo položeno velké sklo ošetřenou plochou nahoru. Po stranách velkého skla byly položeny 0,4 mm silné spacers, na které bylo položeno malé sklo ošetřenou stranou dolů. Spacers byly umístěny do kraje skel a guma spacerů byla těsně přiložena k menšímu sklu. Obě skla byla k sobě v místě spacerů sepnuta pomocí klipsů.
- 4) V kádince byl připraven 6% polyakrylamidový gel, který byl naléván mezi skla.
- 5) Po vyplnění prostoru mezi skly gelem, byl do tohoto prostoru vsunut rovnou stranou hřebínek do hloubky 0,7 až 1 cm. Pomocí čtyř klipsů byla skla v místě hřebínku sepnuta a gel se nechal hodinu polymerizovat.
- 6) Po proběhnutí polymerizace byly odstraněny klipsy a sklo bylo důkladně omyto od zbytků polyakrylamidu. Důraz byl kladen na očištění skla v prostoru hřebínku. Sklo bylo poté osušeno a upevněno do elektroforetické komůrky hranou s hřebínkem nahoru.
- 7) Katodový i anodový prostor byl zalit 0,5 x TBE pufrem. Poté byl hřebínek vytáhnout a vzniklá mezera mezi skly byla vyčištěna proudem pufru z injekční stříkačky. Následovalo uzavření katodového i anodového prostoru, nasazení elektrod a nastavení hodnoty výkonu 90 W na zdroji stejnosměrného elektrického proudu (hodnoty elektrického napětí a proudu byly nastavena na 3 000 V a 150 mA). Gel byl při těchto podmínkách nahříván asi 30 minut.

- 8) Chvilí před dokončením nahřívání byly připraveny vzorky, které vznikly smícháním 10 μ l PCR produktu a 5 μ l nanášecího pufru. Vzorky byly vloženy na 3 minuty do termocykléru, kde byly podrobeny denaturaci. Poté byly okamžitě vloženy do ledové tříště, aby se zabránilo renaturaci.
- 9) Během denaturace byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu. Byl otevřen katodový prostor a mezera pro hřebínek byla opět vyčištěna pomocí proudu pufru z injekční stříkačky. Do této mezery byl vsunut hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu.
- 10) Do mezer mezi zoubky hřebínku bylo napipetováno vždy po 1 μ l denaturovaných vzorků. Po nanesení všech vzorků byl katodový prostor uzavřen, nasazena elektroda a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu byla nastavena hodnota výkonu 70 W (hodnoty elektrického napětí i proudu zůstaly stejné). Čas separace byl nejprve 1,5 hod a následně byl u některých vzorků zvýšen.
- 11) Během elektroforetického dělení vzorků byl připraven fix/stop roztok, 1% roztok HNO_3 a vývojka, která byla uložena do lednice.
- 12) Po uplynutí času elektroforetické separace byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu, elektrody byly odpojeny a byl vypuštěn pufr z katodové části. Poté bylo sklo z elektroforetické komůrky vyjmuto, byly odstraněny spacery a pomocí nože byla od sebe skla oddělána.
- 13) Malé sklo s přilepeným gelem bylo gelem nahoru uloženo do fotomisky, umístěno na třepačku a zalito fix/stop roztokem. Doba působení fix/stop roztoku byla přibližně 20 minut.
- 14) Fix/stop byl slit do baňky a sklo bylo promýváno deionizovanou vodou třikrát po 2 minutách. Poté byl gel 5 minut promýván na třepačce v roztoku 1% HNO_3 . Po vylití roztoku byl gel čtyřikrát po 2 minutách promýván deionizovanou vodou.
- 15) Sklo s gelem bylo umístěno na třepačku do 0,1% roztoku AgNO_3 , do kterého bylo před použitím přidáno 1,2 ml formaldehydu. Doba působení tohoto roztoku na gel byla asi 30 minut.
- 16) Roztok AgNO_3 byl slit do láhve a sklo s gelem bylo ponořeno na 5 vteřin do misky s deionizovanou vodou. Poté bylo sklo přeneseno na třepačku do misky a bylo zalito vývojkou. Bylo sledováno vyvíjení hnědočerných proužků PCR produktů obarvených stříbrem. Když byly proužky dostatečně

zřetelné, vyvíjení bylo zastaveno přilítím fix/stop roztoku, který na gel působil asi 2 minuty.

17) Sklo s gelem bylo poté na 2 minuty ponořeno do deionizované vody a přeneseno minimálně na 30 minut do sušárny, kde byl gel při teplotě 60 °C vysoušen.

18) Gel je poté vyhodnocována na negatoskopu.

19) Sklo s gelem, který již byl vyhodnocen, bylo ponořeno do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l, díky čemuž byl gel ze skla odlepen. Sklo bylo umyto a připraveno k dalšímu použití.

4.5 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (100 mmol/l, 400 μl každého), U 1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol – 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Lachema)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Chloroform (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná – 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová – ledová (Lachema)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)

- N,N'-methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N,N,N',N'-tetramethylendiamin (TEMED) (Serva)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Proteináza K (Sigma)
- Clear Vue, Rain Repellent (Turtle WAX)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.6 Použité roztoky

Zásobní roztok 6% akrylamidu:

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 50 ml 10 x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid:N,N'-methylenbisakrylamid 19:1 po rozpuštění všech složek zfiltrvat a uložit v temné láhvi ve 4 °C

Polyakrylamidový 6% gel:

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

Zásobní roztok 10x TBE pufri:

- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 55 g kyseliny borité H_3BO_3
- 40 ml roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustit v 800 ml deionizované vody
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Fix/stop roztok:

- 88 ml ledové kyseliny octové CH_3COOH
- 800 ml deionizované vody

Nanášecí pufr pro elektroforézu:

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

Roztok 1% kyseliny dusičné HNO_3 :

- 12 ml 65% kyseliny dusičné HNO_3
- 800 ml deionizované vody

Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného AgNO_3 :

- 0,8 g dusičnanu stříbrného AgNO_3
- doplnit objem deionizovanou vodou na 800 ml
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Vývojka:

- 24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3
- 800 ml deionizované vody
- umístit do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než $10\text{ }^\circ\text{C}$
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a $160\text{ }\mu\text{l}$ 1% roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Roztok 10% peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$:

- 1 g peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- rozpustit v 10 ml deionizované vody
- uchovávat v chladničce

Roztok hydroxidu sodného NaOH 1 mol/l:

- 40 g hydroxidu sodného NaOH
- rozpustit v 800 ml deionizované vody
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Molekulární lepidlo:

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

Queen´s pufr:

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,8
- 2 ml zásobního roztoku NaCl (5 mol/l)
- 2,92 g ethylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA)
- 10 g N-lauroylsarkosinu
- rozpustit v 900 ml deionizované vody
- pH upravit na 7,5
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

TE pufr:

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 200 μ l zásobního roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustit v 900 ml deionizované vody
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l a zfiltrvat

4.7 Laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj EV 232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy MARK S 622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette 0,5 μ l až 10 μ l (osmikanálová) (Labsystems)
- Mikropipety Finnpiette 0,3 μ l až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 μ l až 10 μ l (osmikanálová) (Nichiryo)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 μ l až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenční elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna – sterilizátor CAT 8050 (Conthern)
- Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)
- Termocyklér GenePro (BIOER Technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér XP Thermal Cyclers (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5 Výsledky

6 Diskuze

7 Závěr

V této diplomové práci byla ověřena schopnost determinace pohlaví pomocí PCR amplifikace úseku CHD genu s trojkombinací primerů P8/WZ-common/W-specific nejen u čeledi volavkovitých, ale dále byla otestována u dalších zástupců z čeledi čápoovití a ibisovití, ale také u dalších zástupců z čeledí pocházejících z řádů veslonozí, potápky, plameňáci, dlouhokřídlí, sovy, dravci a pěvci. Z celkem testovaných zástupců 15 čeledí bylo možné bezpečně identifikovat pohlaví s touto trojkombinací primerů u jedinců z 13 čeledí pocházejících z řádů brodiví, veslonozí, potápky, plameňáci, dlouhokřídlí a pěvci. U druhu kalous ušatý z řádu sovy a druhu káně lesní z řádu dravci nedošlo ke shodě v určení pohlaví ve srovnání s pohlavím určeným amplifikací s primery P2/P8.

Při amplifikaci s primery P8/WZ-common/W-specific byl u samců přítomen PCR produkt o velikosti 250 – 300 bp. U samic byl přítomen také tento PCR produkt o velikosti 250 – 300 bp a navíc byl přítomen také PCR produkt o velikosti přibližně 140 bp, díky kterému byly samice identifikovány. Výjimkou byl pouze druh rehek zahradní. U 21 z 35 testovaných druhů bylo možné samice identifikovat díky dalšímu PCR produktu o velikosti 250 – 300 bp a tyto druhy tudíž měly dva determinující úseky.

Determinace pohlaví pomocí páru primerů P2/P8 byla úspěšná pouze u 29 z 35 testovaných druhů na rozdíl do determinace pohlaví s trojkombinací primerů P8/WZ-common/W-specific, která byla úspěšná u 33 z 35 testovaných druhů. Kombinace primerů P2/P8 je používána jako univerzální pro determinaci pohlaví. Její univerzalita se ovšem nepotvrdila.

Primery P8/WZ-common/W-specific bych navrhovala využít k determinaci pohlaví u ptáků univerzálně. Amplifikací s těmito primery jsem dokonce u 21 z 35 testovaných druhů získala dvě determinační místa pro rozpoznání pohlaví. Determinace pohlaví s primery P8/WZ-common/W-specific byla v mé diplomové práci úspěšnější než determinace pohlaví s primery P2/P8. Primery P2/P8 bych navrhovala použít jako druhou sadu primerů u druhů, u kterých selže identifikace pohlaví s primery P8/WZ-common/W-specific. Nevýhodou determinace pohlaví s primery P8/WZ-common/W-specific je nutnost separace PCR produktů v polyakrylamidovém gelu.

8 Seznam zkratek

A	adenin
AFLP	polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů (<i>amplified fragment length polymorphism</i>)
ARMS	amplifikaci nedostupný mutační systém (<i>amplification-refractory mutation system</i>)
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
C	cytozin
CHD	gen pro <i>chromo-helicase/ATPase-DNA binding</i> protein
DMRT1	gen pro <i>doublesex and mab-3-related transcription factor 1</i>
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát (<i>deoxyribonucleoside triphosphate</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
G	guanin
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
RAPD	polymorfizmus náhodně amplifikované DNA (<i>random amplified polymorphic DNA</i>)
RFLP	polymorfizmus délky restričních fragmentů (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
SCAR	amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí (<i>sequenced characterized amplified region</i>)
SSCP	polymorfizmus konformace jednovláknové DNA (<i>single-strand conformation polymorphism</i>)
T	thymin
T _a	teplota <i>annealingu</i>

9 Použitá literatura

Bello N, Sánchez A (1999): The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Molecular Ecology* 8, 667 – 669.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *The American Journal of Human Genetics* 32, 314 – 331.

Boutette JB, Ramsay EC, Potgieter D, Kania S (2002): An improved polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism assay for gender identification in birds. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 16, 198 – 202.

Burnie D (2008): Ptáci. Obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha.

Dawson DA, Darby S, Hunter FM, Krupa AP, Jones IL, Burke T (2001): A critique of avian CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. *Molecular Ecology Notes* 1, 201 – 204.

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

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

Donohue KC, Dufty AM (2006): Sex determination of Red-tailed Hawks (*Buteo jamaicensis calurus*) using DNA analysis and morphometrics. *Journal of Field Ornithology* 77, 74 – 79.

Doosti A, Fathpour H, Moshkelani S (2009): Sex identification in the canary using DNA typing methods. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 12, 207 – 211.

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

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

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

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

Ellegren H (2000): Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends in Ecology & Evolution* 15, 188 – 192.

Ericson PGP, Anderson CL, Britton T, Elzanowski A, Johansson US, Källersjö M, Ohlson JI, Parsons TJ, Zuccon D, Mayr G (2006): Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters* 2, 543 – 547.

Ferguson-Smith M (2007): The evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates and the key role of DMRT1. *Sexual Development* 1, 2 – 11.

Fridolfsson AK, Cheng H, Copeland NG, Jenkins NA, Liu HC, Raudsepp T, Woodage T, Chowdhary B, Halverson J, Ellegren H (1998): Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8147 – 8152.

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

Gaisler J, Zima J (2007): Zoologie obratlovců, 2. přepracované vydání. Academia, Praha.

Gasser RB, Hu M, Chilton NB, Campbell BE, Jex AJ, Otranto D, Cafarchia C, Beveridge I, Zhu X (2007): Single-strand conformation polymorphisms (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols* 1, 3121 – 3128.

Graves JAM, Shetty S (2001): Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *Journal of Experimental Zoology* 290, 449 – 462.

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

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

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

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

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

Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG (1998): A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7, 1071 – 1075.

Griffiths R, Orr K (1999): The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Molecular Ecology* 8, 671 – 674.

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

Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, Braun MJ, Chojnowski JL, Cox WA, Han KL, Harshman J, Huddleston CJ, Marks BD, Miglia KJ, Moore WS, Sheldon FH, Steadman DW, Witt CC, Yuri T (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763 – 1768.

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

Childress B, Harper D, Hughes B, Ferris C (2005): Sex determination in the Lesser Flamingo (*Phoenicopterus minor*) using morphological measurements. *Ostrich* 76, 148 – 153.

Ito H, Sudo-Yamaji A, Motoko A, Murase T, Tsubota T (2003): Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. *Zoological Science* 20, 339 – 344.

Jarvi SI, Farias MEM (2006): Molecular sexing and sources of CHD1-Z/W sequence variation in Hawaiian birds. *Molecular Ecology Notes* 6, 1003 – 1005.

Jensen T, Pernasetti FM, Durrant B (2003): Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. *Zoo Biology* 22, 561 – 571.

Kahn NW, John JS, Quinn TW (1998): Chromosome-specific intron size differences in avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. *The Auk* 115, 1074 – 1078.

Kapil R (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations. Disertační práce. Depon in: University of North Texas.

Kloskowski J, Grela P, Krogulec J, Gaska M, Tchórzewski M (2006): Sexing Red-Necked Grebes *Podiceps grisegena* by Molecular Techniques and Morphology. *Acta Ornithologica* 41, 176 – 180.

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

Lessells CM, Mateman AC (1998): Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology* 7, 187 – 195.

Little S (2001): Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) analysis of point mutations. 7: 9.8.1. – 9.8.12. In: Dracopoli NC: *Current Protocols in Human Genetics*. Wiley, John & Sons, Incorporated, New York.

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

Longmire JL, Maltbie M, Pavelka RW, Smith LM, Witte SM, Ryder OA, Ellsworth DL, Baker RJ (1993): Gender identification in birds using microsatellite DNA fingerprint analysis. *The Auk* 110, 378 – 381.

Martin CA, Alonso JC, Alonso JA, Morales MB, Pitra C (2000): An approach to sexing young Great Bustards *Otis tarda* using discriminant analysis and molecular techniques. *Bird Study* 47, 147 – 153.

Miyaki CY, Griffiths R, Orr K, Nahum LA, Pereira SL, Wajntal A (1998): Sex identification of Parrots, Toucans, and Curassows by PCR: Perspectives for wild and captive population studies. *Zoo Biology* 17, 415 – 423.

Morgan-Richardson M, Trewick SA, Bartosch-Härlid A, Kardailsky O, Phillips MJ, McLenachan PA, Penny D (2008): Bird evolution: testing the Metaves clade with six new mitochondrial genomes. *BMC Evolutionary Biology* 8:20.

Nanda I, Zend-Ajusch E, Shan Z, Grützner F, Scharl M, Burt DW, Koehler M, Fowler VM, Goodwin G, Schneider WJ, Mizuno S, Dechant G, Haaf T, Schmid M (2000): Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenetics and Cell Genetics* 89, 67 – 78.

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

Ong AHK, Vellayan S (2007): An evaluation of CHD-specific primer sets for sex typing of birds from feathers. *Zoo Biology* 27, 62 – 69.

Peters JL, Cottrell GW, Greenway JC, Mayr E, Paynter RA, Traylor MA (1931 – 1987): Check-list of Birds of the World. Harvard University Press. Cambridge.

Ramos PS, Bastos E, Mannan RW, Guedes-Pinto H (2009): Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism applied to sex identification of *Accipiter cooperii*. *Molecular and Cellular Probes* 23, 115 – 118.

Roldan ERS, Gomendio M (1999): The Y chromosome as a battle ground for sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* 14, 58 – 62.

Sawyer GM (2002): DNA profiling of captive Roseate Spoonbill (*Ajaia ajaja*) populations as a mechanism of determining lineage in colonial nesting birds. Disertační práce. Depon in: University of North Texas.

Seki SI (2003): Molecular sexing of individual Ryukyu Robins *Erithacus komadori* using buccal cells as a non-invasive source of DNA. *Ornithological Science* 2, 135 – 137.

Schořová L (2012): Nový systém molekulární determinace pohlaví u volavek a jeho aplikace u dalších vodních ptáků. Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Sibley CG, Monroe BL (1990): *Distribution and Taxonomy of Birds of the World*. Yale University Press, Yale.

Stiglec R, Ezaz T, Graves JAM (2007): A new look at the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 117, 103 – 109.

Stokes DG, Tartof KD, Perry RP (1996): CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7137 – 7142.

Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J (2005): *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno.

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

Šťastný K, Bejček V, Vašák P (1998b): *Svět zvířat V, Ptáci (2)*. Albatros, Praha.

Šťastný K, Bejček V, Vašák P (1999): *Svět zvířat VI, Ptáci (3)*. Albatros, Praha.

Thanou E, Giokas S, Goutner V, Liordos V, Tsolis-Fraguedakis S (2013): Efficiency and accuracy of PCR-based sex determination methods in the European Phalacrocoracidae. *Annales Zoologici Fennici* 50, 52 – 63

Vucicevic M, Stevanovic J, Simeunovic P, Vucicevic I, Đelic N, Stanimirovic Z. (2012a): Analysis of the CHD gene for sex determination of protected bird species. In: *Proceedings of the International symposium on hunting »Modern aspects of sustainable management of game population«*. 83 – 86

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

Wang N, Zhang ZW (2009): The novel primers for sex identification in the brown eared-pheasant and their application to other species. *Molecular Ecology Resources* 9, 189 – 188.

Wang Z, Zhou X, Lin Q, Fang W, Chen X (2011): New primers for sex identification in the Chinese Egret and other ardeid species. *Molecular Ecology Resources* 1, 176 – 179.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531 – 6535.

Woodage T, Basrai MA, Baxevanis AD, Hieter P, Collins FS (1997): Characterization of the CHD family of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11472 – 11477.

Zima J, Macholán M, Munclinger P, Piálek J (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.