

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Studijní program: B4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Optimalizace izolace DNA ptáků pro použití při
determinaci pohlaví**

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Vernerová Kateřina

Konzultant bakalářské práce: Ing. Jelínková Irena

Autor bakalářské práce: Hana Dillingerová

České Budějovice, 2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Hana DILLINGEROVÁ**
Osobní číslo: **Z13680**
Studijní program: **B4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu: **Optimalizace izolace DNA ptáků pro použití při determinaci pohlaví**
Zadávající katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

V současné době se chovatelé zvířat v zájmových chovech stále více spoléhají na využití molekulárně genetických metod. Vzhledem k tomu, že determinace pohlaví mláďat mnoha druhů ptáků je na základě morfologických znaků neproveditelná, nabízí analýza DNA snadné a spolehlivé řešení při sestavování chovných párů s přihlédnutím k jejich etologickým potřebám. Kromě determinace pohlaví, je analýza DNA u ptáků též využívána k ověření parentity, či stanovení genetického profilu jedince a v nejbližší době pravděpodobného určování genetického založení zbarvení ptáků. Aplikace molekulárně genetických metod je kromě chovu a ochrany jednotlivých druhů nezbytná i při studiu ekologie či evoluční biologie.

Cílem práce je především shromáždění literárních zdrojů a vypracování literární rešerše na dané téma. Zaměřte se na souhrn různých izolačních technik DNA a dále pak popište nejčastější analýzy prováděné u ptáků v oblasti molekulární biologie. Nedílnou součástí bude i stručný popis historie analýzy a struktury genomu ptáků.

V experimentální části se zaměřte na izolaci DNA ptáků s využitím různých technik a tkání. Výtěžek extrahované DNA bude ověřen měřením koncentrace za použití dostupného laboratorního vybavení a kvalita DNA pak bude posouzena dle výsledků PCR.

Závěrem bakalářské práce bude zhodnocení vhodnosti použitých izolačních technik, a to s přihlédnutím především k míře invaze při odběru vzorku DNA, dále pak k celkové náročnosti postupu izolace a celkovému výtěžku DNA u jednotlivých technik. Na základě závěru doporučte odběrovou techniku vhodnou pro chovatele i metodiku extrakce DNA pro laboratorní použití.

Rozsah grafických prací: 5 stran
Rozsah pracovní zprávy: 25 - 30 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná
Seznam odborné literatury:


Brown A. T. (2007): Klonování genů a analýza DNA. Univerzita Palackého, Olomouc
Doosti, A., Fathpour H., Moshkelani S. (2009): Sex identification in the canary using DNA typing methods. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 12, 207-211
Jarvis E. et al. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. Science 346 (6215), 1320-1331
Suh A. et al. (2015): Multiple Lineages of Ancient CR1 Retroposons Shaped the Early Genome Evolution of Amniotes. Genome Biology and Evolution 1, 205-217
Veselovský Z. (2001): obecná ornitologie. Academia, Praha

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Kateřina Vernerová
Katedra speciální produkce rostlinné
Konzultant bakalářské práce: Ing. Irena Jelínková
Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání bakalářské práce: 24. února 2016
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2016


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvská 1668, 370 05 České Budějovice


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 22. února 2016

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Kateřině Vernerové za cenné připomínky, důležité informace, vstřícnost, trpělivost a odborné rady, kterými přispěla k vypracování této bakalářské práce. Dále také Ing. Ireně Jelínkové a RNDr. Pavlíně Věchtové za odbornou konzultaci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za trpělivost, podporu a povzbuzování po dobu mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Optimalizace izolace DNA ptáků pro použití při determinaci pohlaví vypracovala samostatně pod vedením Ing. Kateřiny Vernerové s použitím pramenů a literatury uvedené na seznamu, který tvoří přílohu této práce.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne.....

Podpis.....

Abstrakt

Včasná a spolehlivá determinace pohlaví ptáků je důležitá v zájmových, záchranných i produkčních chovech. S přihlédnutím k pohlavnímu monomorfismu mláďat či dospělých jedinců většiny druhů ptáků se v dnešní době stále častěji používá spolehlivé, přesné a rychlé metody identifikace pohlaví ptáků, pomocí PCR. Cílem bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše o různých metodách vhodných pro určování pohlaví ptáků. V experimentální části pak vybrat nejvhodnější metodu izolace DNA u ptáků a ověřit použitelnost vyizolované DNA pro determinaci pohlaví ptáků pomocí PCR. Vzorky pro izolaci DNA byly odebírány z nasbíraných vzorků krycího peří a stěru buněk bukální sliznice zvířat umístěných na školním statku v Českých Budějovicích a od zvířat soukromých chovatelů v průběhu roku 2015 a 2016. Celkem byly odebrány vzorky od 5 druhů ptáků a srovnávány 3 techniky izolace DNA. Ze souboru 17 vzorků byla vždy izolována DNA všemi 3 technikami, a sice duplicitně – z krycího peří a stěrů bukální sliznice. Pro determinaci pohlaví byla použita metoda PCR. Z hlediska největších výtěžků DNA a zároveň nízké náročnosti jak časové, tak technické, se jako nejlepší ukázala metodika izolace Chelexem 100. Zjištěné poznatky byly průběžně srovnávány s již existující literaturou.

Klíčová slova: Izolace DNA, PCR, ptáci, determinace pohlaví, SDS, Chelex, CTAB-PVP, *CHDI*

Abstract

The timely and reliable bird sex determination is important in hobby, rescue and production breeding. Taking into account sex monomorphism of majority young and adult bird species, currently PCR method is more and more used due to its reliability, accuracy and swiftness. The aim of the bachelor thesis is to work up literary research on various methods suitable for bird sex determination. Furthermore, the experimental section of this work to determine the best suitable bird sex DNA isolation method and verifies the applicability of the isolated DNA for bird sex determination by PCR. The samples for DNA isolation were extracted from collected feathers and buccal swabs of animals kept on the university farm located in České Budějovice and of private animal keepers within the period of year 2015 and 2016. In total there were 5 bird species samples extracted and 3 DNA isolations techniques compared. From the collection of 17 samples there was always DNA isolated by using all 3 techniques - namely both from the feathers and buccal swabs. PCR method was used for sex determination. Chelex 100 isolation method turned out to be the most effective from the highest DNA yield, low time and technical demands points of view. The results of the research were continuously compared with results described in the available bibliography.

Key words: DNA isolation, PCR, birds, sex determination, SDS, Chelex, CTAB-PVP, *CHDI*

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle.....	10
3	Literární přehled	11
3.1	Genom ptáků	11
3.2	Určování pohlaví ptáků	13
3.2.1	Určování pohlaví na základě morfometrických a morfologických hodnot.....	14
3.2.2	Laparotomie a laparoskopie	15
3.2.3	Rozlišování pohlaví sexaskopem	15
3.2.4	Japonská kloakální metoda sexování	16
3.2.5	Autosexingové metody sexování.....	17
3.2.6	Autosexing barevný (colorsexing)	17
3.2.7	Peříčková metoda (feathersexing).....	18
3.2.8	Určování pohlaví ptáků analýzou DNA	19
3.2.8.1	Určování pohlaví ptáků nadřádu letců	19
3.2.8.2	Určování pohlaví ptáků nadřádu běžců.....	19
3.3	Laboratorní metody determinace pohlaví ptáků na základě analýzy DNA	20
3.3.1	Izolace DNA.....	20
3.3.1.1	Nejčastější izolační metody	20
3.3.1.2	Elektroforéza.....	22
3.3.1.3	PCR.....	22
3.3.2	Sekvenování	23
4	Materiál a metody	25
4.1	Vzorky	25
4.2	Odběr biologického materiálu	25
4.2.1	Peří.....	25
4.2.2	Stěr bukalní sliznice	26
4.3	Izolace DNA	27
4.3.1	Izolace DNA modifikovanou metodou SDS.....	27
4.3.2	Izolace DNA pomocí CTAB - PVP	28
4.3.3	Izolace DNA Chelexem 100.....	30

4.4	Ověření výtěžku a čistoty DNA	31
4.5	PCR	31
4.6	Elektroforéza	33
5	Výsledky	35
6	Diskuze	43
7	Závěr	46
8	Literatura.....	47
9	Přílohy.....	54
9.1	Obrázky	54

1 Úvod

V současné době se chovatelé zvířat v zájmových chovech stále více spoléhají na využití molekulárně genetických metod. Včasné a spolehlivé určení pohlaví ptáků je důležité nejen v zájmových, ale i záchranných a produkčních chovech nebo např. chovech určených k vědeckým účelům. Kromě determinace pohlaví je analýza DNA u ptáků též využívána k ověření parentity, či stanovení genetického profilu jedince.

Determinace pohlaví u ptáků není obecně zcela jednoduchá. V některých případech lze pohlaví určit na základě rozdílu ve velikosti, zbarvení, tvaru těla či hlasových projevů, nicméně velké množství druhů je pohlavně monomorfních, tzn., že samci i samice vykazují velice podobné, těžko či zcela nerozpoznatelné fenotypové znaky. V těchto případech není možné determinovat pohlaví běžnými metodami, jako je např. morfologická a morfometrická analýza. Naproti tomu laparotomie a laparoskopie jsou invazivní chirurgické zákroky a např. japonská kloakální metoda je proveditelná pouze u některých druhů ptáků. Proto se v dnešní době přistupuje čím dál tím více ke spolehlivé, přesné a rychlé metodě identifikace pohlaví ptáků, kterou je analýza DNA pomocí PCR, používaná u široké škály ptačích druhů. Pro tuto analýzu je důležitý vstupní materiál, tedy DNA o dostatečné kvantitě a kvalitě, přičemž v současnosti se především s přihlédnutím k welfare zvířat volí pokud možno neinvazivní metody odběru biologického materiálu. Technika odběru biologického materiálu, snadnost a rychlost provedení izolace DNA a v neposlední řadě též ekonomický aspekt izolačních technik má zásadní vliv na provedení a rentabilitu následné PCR.

2 Cíle

Cílem této práce bylo shromáždění literatury zaměřené na různé metody izolace DNA ptáků pro použití při determinaci pohlaví, dále pak odběr vzorků biologického materiálu, izolace DNA, determinace pohlaví pomocí PCR a zhodnocení použitých metodik izolace DNA.

Dílní cíle:

- Vypracování rešeršní část na dané téma.
- Izolace DNA z peří a stěrů buněk bukalní sliznice ptáků pro určení jejich pohlaví.
- Ověření kvality DNA determinací pohlaví na základě DNA.
- Porovnání výsledků práce s již existující literaturou.
- Zhodnocení vhodnosti použitých izolačních technik.

3 Literární přehled

3.1 Genom ptáků

Genom je soubor veškeré dědičné informace, tedy molekul DNA (popř. RNA) příslušného organismu nebo konkrétní buňky. U eukaryotické buňky se nachází největší část genomu v jejím jádře, tudíž se tento genom nazývá jaderný. Naproti tomu pokud je genom uložený v mitochondriích nebo plastidech nazývá se mimojaderný. Molekula DNA může být kružnicová (prokaryota, DNA-viry, extrachromozomální – mitochondriální, plazmidová) nebo lineární (eukaryota, DNA-viry) (Šmarda, 2003; Flegr, 2009; Snustad a Simmons, 2009). DNA je společně s histony a jinými specifickými proteiny formována ve strukturu zvanou chromozom. Soubor všech chromozomů v buněčném jádře se nazývá karyotyp, přičemž každá somatická buňka v živočišném organismu má konkrétní (druhově specifický) počet párů autozomů a jeden pár gonozomů (pohlavních chromozomů). Jeden chromozom z páru je vždy maternálního a druhý paternálního původu. Grafickým znázorněním karyotypu je tzv. karyogram nebo idiogram. Každý chromozom v tomto znázornění je specificky označen - autozomy čísly, gonozomy písmeny. V případě pohlavního typu *Drosophila* (např. savci, *Mammalia*) se jedná o pohlavní chromozomy X a Y. Ptáci (*Aves*) patří k pohlavnímu typu *Abraxas* a gonozomy jsou označovány jako Z, W. U ptáků jsou samice heterogametní - ZW a samci homogametní – ZZ. U savců je to obráceně; samice – XX, samci XY (Kočárek, 2004).

Ptáci jsou s počtem přes 10 tisíc druhů žijících v rozmanitých nikách po celém světě, druhově nejbohatší skupinou čtyřnožců (*Tetrapoda*). Často slouží jako modelové organizmy v mnoha odvětvích výzkumu. Do roku 2010 byly přečteny celé genomy jen tří ptačích druhů: kura bankivského (*Gallus gallus*), zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a krocana divokého (*Meleagris gallopavo*). V prosinci roku 2014 byly publikovány závěry mezinárodního sekvenačního programu Avian Phylogenomics Project, trvajících 4 roky, jehož výsledkem je čtyřicet pět nově osekvenovaných kompletních ptačích genomů. Jednotlivé druhy ptáků byly zvolené tak, aby reprezentovali 32 řádů podtřídy Letců (*Neognathae*) a 2 z 5 řádů podtřídy Běžců (*Paleognathae*). Kromě celogenomových sekvencí program přinesl i komplexní studie evoluce genomů, včetně pohlavních chromozomů, rekonstrukce genomové struktury dinosaurů, analýzu nekódujících RNA, endogenních virových

elementů a jejich funkcí v ptačím genomu, atd. (Avian Phylogenomics Project, 2014).

Tab. 1: Souhrn druhů ptáků s kompletně osekvenovaným genomem (Avian Phylogenomics Project, 2014)

Latinský název	Český název	Latinský název	Český název
<i>Acanthisitta chloris</i>	pokřovník zelený	<i>Haliaeetus albicilla</i>	orel mořský
<i>Anas platyrhynchos</i>	kachna divoká	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	orel bělohlavý
<i>Antrostomus carolinensis</i>	lelek karolínský	<i>Leptosomus discolor</i>	kuroł madagaskarský
<i>Apaloderma vittatum</i>	trogon horský	<i>Manacus vitellinus</i>	pipulka zlatokrká
<i>Aptenodytes forsteri</i>	tučňák císařský	<i>Meleagris gallopavo</i>	krocan divoký
<i>Balearica regulorum</i>	jeřáb královský	<i>Melopsittacus undulatus</i>	andulka vlnkovaná
<i>Buceros rhinoceros</i>	dvojborožec velký	<i>Merops nubicus</i>	vlha núbijská
<i>Calypte anna</i>	kalypta růžovohlavá	<i>Mesitornis unicolor</i>	mesit hnědý
<i>Cariama cristata</i>	seriema rudozobá	<i>Nestor notabilis</i>	nestor kea
<i>Cathartes aura</i>	kondor krocanovitý	<i>Nipponia nippon</i>	ibis čínský
<i>Chaetura pelagica</i>	rorýs ostnitý	<i>Opisthocomus hoazin</i>	hoacin chocholatý
<i>Charadrius vociferus</i>	kulík zrzoocasý	<i>Pelecanus crispus</i>	pelikán kadeřavý
<i>Chlamydotis macqueenii</i>	drop hřívnatý	<i>Phaethon lepturus</i>	faeton žlutozobý

<i>Colinus striatus</i>	myšák hnědokřídlý	<i>Phalacrocorax carbo</i>	kormorán velký
<i>Columba livia</i>	holub skalní	<i>Phoenicopterus ruber</i>	plameňák americký
<i>Corvus brachyrhynchos</i>	vrána americká	<i>Picoides pubescens</i>	strakapoud osikový
<i>Cuculus canorus</i>	kukačka obecná	<i>Podiceps cristatus</i>	potápka roháč
<i>Egretta garzetta</i>	volavka stříbřitá	<i>Pterocles gutturalis</i>	stepokur žlutohrdlý
<i>Eurypyga helias</i>	slunatec nádherný	<i>Pygoscelis adeliae</i>	tučňák kroužkový
<i>Falco peregrinus</i>	sokol stěhovavý	<i>Struthio camelus</i>	pštros dvouprstý
<i>Fulmarus glacialis</i>	buňňák lední	<i>Taeniopygia guttata</i>	zebrička pestrá
<i>Gallus gallus</i>	kur bankivský	<i>Tauraco erythrolophus</i>	turako červenokorunkatý
<i>Gavia stellata</i>	potáplice malá	<i>Tinamus guttatus</i>	tinama tečkovaná
<i>Geospiza fortis</i>	pěnkavka prostřední	<i>Tyto alba</i>	sova pálená

3.2 Určování pohlaví ptáků

Determinace pohlaví u ptáků není obecně zcela jednoduchá. V některých případech lze pohlaví určit na základě rozdílu ve velikosti, zbarvení, tvaru těla či hlasových projevů. Mezi druhy s výrazným pohlavním dimorfismem patří např. kachna divoká (*Anas platyrhynchos*), bažant obecný (*Phasianus colchicus*), či páv korunkatý (*Pavo cristatus*) (Andersson, 1995).

Nicméně velké množství druhů je pohlavně monomorfních, tzn., že samci i samice vykazují velice podobné, těžko rozpoznatelné fenotypové znaky. Griffiths a Phil (2000) uvádí, že více než u poloviny druhů ptáků není možné na základě

fenotypu determinovat pohlaví adultních jedinců. U většiny druhů, a to i u druhů výrazně pohlavně dimorfních, je na základě morfologických znaků nemožné rozpoznat pohlaví mláďat. Ta lze rozlišit často nejdříve až několik týdnů po vylíhnutí (Dubiec a Zagalska-Neubauer, 2006). Existují i druhy vykazující silné sezónní kolísání pohlavně dimorfních znaků, kdy např. zbarvení pro samce typické, mimo období páření zmizí zcela či je téměř nezřetelné (Coyne et al., 2008).

Včasná a spolehlivá identifikace pohlaví ptáků je důležitá pro chov, ochranu a zachování druhů či vědecký výzkum (Griffiths a Phil, 2000). Velké množství programů ochrany ptactva zaměřených na záchranu a uchování druhů s využitím intenzivního chovu, stejně jako zoologické zahrady, je závislé na časně determinaci pohlaví k sestavení chovných skupin či párů (Vucicevic et al., 2013). Např. u dravců chovaných v zajetí je časně sestavení páru, mnohdy v trvání několika let před plánovanou reprodukcí, esenciální pro úspěšné rozmnožování, přičemž zároveň je zvyšována šance na úspěch během první reprodukční sezóny (Jenny et al., 2004; Platt et al., 1989).

3.2.1 Určování pohlaví na základě morfometrických a morfologických hodnot

Morfologie byla na konci 18. století definována jako obor zabývající se zákonitostmi vzniku a přeměny živých tvarů v přírodě. V 19. století se stala základním biologickým oborem. Na konci 20. století nastal veliký úpadek morfologie. Došlo k rozvoji ve výzkumu nukleových kyselin, biochemie a molekulární biologie a morfologie se stala pouze pomocnou disciplínou. V současnosti se z morfologických specializací využívá především morfometriky. Základem morfometriky původně bylo statistické hodnocení vzdáleností a úhlů na tělech a strukturách zkoumaných organismů (měření tvarů). V první polovině 20. století britský biolog D'Arcy Thompson ukázal, že proměny i hodně složitých tvarů, lze matematicky vyjádřit pouhými transformacemi souřadnicových mřížek. Deformace těchto mřížek je možno matematicky popsat a „porozumět“ tak charakteru morfologické dynamiky ve zkoumané skupině. Geometricko–morfometrická analýza umožňuje modelovat celkovou tvarovou změnu mezi každou dvojicí z celé sady zkoumaných objektů (Neustupa, 2006). U mláďat se sledují

a zaznamenávají měrné hodnoty délky těla, křídla, 5. ruční letky, běháku, celková hmotnost, růst opeření v různém stádiu vývoje a věku. Na základě získaných dat je poté stanovena technika jak určovat stáří a pohlaví mláďat přímo na hnízdech v přírodním prostředí. Biometrická data přispěla k rozlišování pohlaví a určování věku mláďat na hnízdech (Kunstmüller, 2012).

3.2.2 Laparotomie a laparoskopie

Při laparotomii je incize vedena mezi posledními dvěma žebry, která jsou roztažena od sebe, a s pomocí vhodného svítidla je zajištěna optická kontrola gonád. Mezi nejčastější komplikace této techniky patří poškození vzdušného vaku, krvácení či kulhání. Zákrok byl nejčastěji prováděn bez anestezie popř. s lokálním znecitlivěním. V současné době se tato metoda již nepoužívá (Risser, 1971; Richner, 1989; Piper a Wiley, 1991).

Před zavedením metody určování pohlaví ptáků pomocí analýzy DNA, mohla být pohlavní determinace u mnoha druhů ptáků spolehlivě provedena pouze endoskopickou metodou. Laparoskopie je endoskopické vyšetření prováděné v celkové anestezii. Malým otvorem je do tělní dutiny zaváděn laparoskop o vhodném průměru. Ten má integrovaný optický kabel s kamerou a světelným zdrojem. Determinace gonád je prováděna prostřednictvím obrazovky či monitoru (Richner, 1989). Ačkoliv je tento zákrok v porovnání s laparotomií miniinvazivní, stále se jedná o invazivní metodu.

3.2.3 Rozlišování pohlaví sexaskopem

Tato metoda navržená pro sexování drůbeže byla založena na zavedení sexaskopu, tedy světelné sondy do kloaky a střeva mláďete tak, aby její zorné pole bylo v blízkosti gonád. Použití sexaskopu bylo vzhledem k nutnosti manipulace v kolace natolik rizikové, že se tato technika v praxi vůbec neujala (Šatava et al., 1984).

3.2.4 Japonská kloakální metoda sexování

Metoda je založena na anatomických a morfologických rozdílech v utváření části kloakální sliznice. Je použitelná u všech kuřat různých plemen, včetně kříženců, i u všech ostatních druhů drůbeže, přičemž tento princip lze využít i u dospělců druhů, kde buď vůbec není nebo je jen nezřetelně vyjádřen pohlavní dimorfismus (např. u hus). Na tomto principu byla tříděna kuřata již před několika stoletími na trzích v Číně, Japonsku a Koreji. Metodu poprvé popsali japonští vědci Masui a Hashimoto v roce 1925, přičemž do běžné praxe přešla asi v roce 1930 s následnou modifikací vedoucí k snížení rizika úhynů. U samčích jedinců je v genitální oblasti kloaky vyvinut velký rudimentální pohlavní orgán (analogie penisu), sexátory nazýván jako pohlavní výčnělek, přičemž u samců vodní drůbeže je zřetelně vyvinutý pravý penis. Pohlavní výčnělek je v průměru asi 1 mm velký, polokulovitěho tvaru s kruhovou základnou, od okolní sliznice oddělenou zřetelnou brázdou. Výčnělek vystupuje ze sliznice kolmo, má pevný, kompaktní charakter a při manipulaci zásadně nemění svůj tvar. U samic dochází ke konci inkubace k rychlé atrofii tohoto útvaru, takže po vylíhnutí se jeví pouze jako vystouplá ploška nazývaná pohlavní výstupek. Jedná se o jazýčkovitý, dorzoventrálně zploštělý útvar s elipsovou základnou. Na rozdíl od samců není základna oddělena brázdou a výstupek při manipulaci neudrží původní tvar a nevykazuje kompaktnost. Tvarově a velikostně jsou pohlavní výstupky i výčnělky značně rozmanité (Šatava et al., 1984).

Optimální doba pro toto třídění je 3 až 12 h po vylíhnutí, ideálně do 24 h. Zkušený sexátor může dosáhnout až 99 % úspěšnosti u hrabavé drůbeže, nicméně metoda je velice náročná na zručnost a schopnosti sexátora. Jedná se o jednu z nejrozšířenějších a nejspolehlivějších metod determinace pohlaví používanou především u plemenné drůbeže ve šlechtitelských chovech či u nosných hybridů. U krů'at lze sexování provádět stejným způsobem, s tím rozdílem, že metodu lze využít během celého života jedince. U starších jedinců lze pohlaví rozlišit snáz než u mladších, přičemž krocan disponuje dvěma pevnými genitálními výrůstky a analogicky krůta dvěma ochablejšími výstupky. Vodní drůbež lze sexovat po celý život jedince, přičemž samec má zřetelně vyvinutý penis spirálovitě stočený do tzv. semenné brázdy (Šatava et al., 1984; Brouček et al., 2011).

3.2.5 Autosexingové metody sexování

Na rozdíl od japonské kloakální metody, jsou autosexingové metody založené na genetickém základě. Některé fenotypové znaky (např. zbarvení či rychlost opeření) jsou geneticky vázané na pohlavních chromozomech (W), kdy nositelem tohoto znaku jsou samice (typ Abraxas). Při zkřížení tohoto genotypu (ZW) s genotypem samčím (ZZ), dochází u potomstva k přenosu znaku tzv. „křížem“, kdy se konkrétní znaky objeví pouze u jedinců samčího pohlaví. Obvykle se využívají dva typy autosexingu, barevný autosexing nebo tzv. peříčková metoda (Šatava et al., 1984; Snustad a Simmons, 2009; Brouček et al., 2011).

3.2.6 Autosexing barevný (colorsexing)

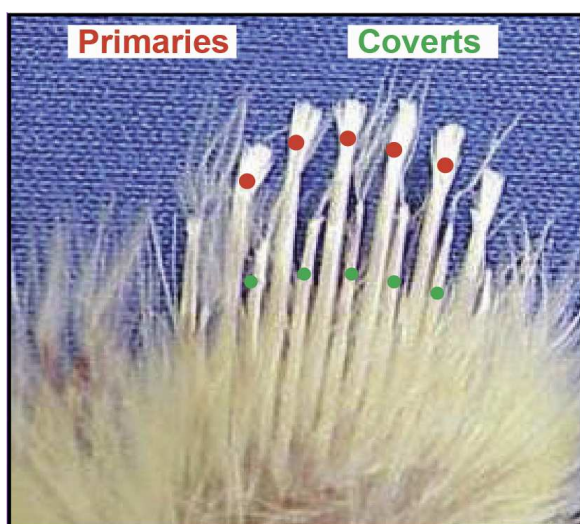
Efektivním znakem pro třídění je zbarvení juvenilního peří, popř. zbarvení kůže běháků. Konkrétně se jedná o gen žíhanosti *B* (Barred) a stříbřitosti *S* (Silver). Metoda má využití především u finálních hybridů nosného typu. Nese-li matka dominantní gen *S*, budou díky přenosu znaku „křížem“ samčí potomci stříbrného zbarvení. V případě křížení žíhaných jedinců s nežíhanými je u jedinců F1 generace diferenciacním znakem přítomnost bílé skvrny na hlavě (Šatava et al., 1984).



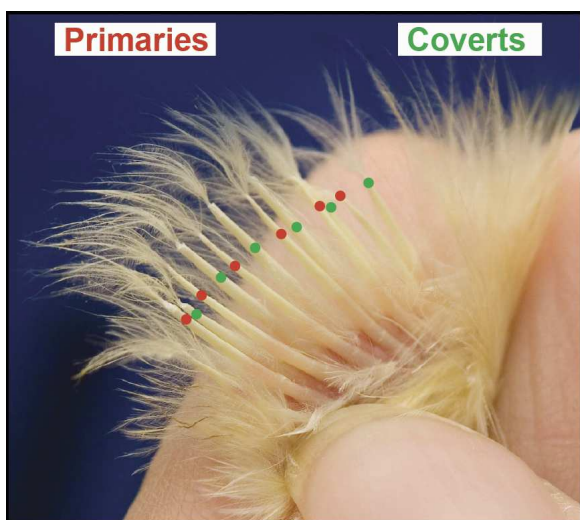
Obr. 1: Zbarvení juvenilního peří: u kuřat samčího pohlaví se projevil znak vázaný na dominantní gen stříbřitosti *S* (Backyardchickens, 2016)

3.2.7 Peříčková metoda (feathersexing)

Diferenciace pohlaví probíhá na základě rychlosti růstu letek I. řádu a velkých křídelních krovek, přičemž metoda se používá především u finálních hybridů masného typu a nosného typu s produkcí bílých vajec. Determinaci umožňuje existence genu pomalého opeřování *K* (kurzer Flügel), který je vázaný na pohlavní chromozom *W*. Při křížení slepic s genotypem pomalého opeřování *K* s kohouty s genotypem pro rychlé opeřování *k*, dědí F1 potomstvo daný znak křížem. Tzn., že samčí potomstvo bude mít znaky pomalého opeřování – primární letky o polovinu delší než křídelní krovky a u samic budou oba typy peří vyvinuty stejně (McGibbon, 1977; Šatava et al., 1984).



Obr. 2: Peříčková metoda – samice kuřat (Hyline, 2016)



Obr. 3: Peříčková metoda – samec kuřat (Hyline, 2016)

3.2.8 Určování pohlaví ptáků analýzou DNA

Spolehlivou, přesnou a rychlou metodou jak identifikovat pohlaví ptáků, je analýza DNA, která se dá použít u široké škály ptačích druhů. Jak již bylo zmíněno, u ptáků jsou samice heterogametní, s gonozomy ZW, naopak homogametní samci mají chromozomy ZZ (Kočárek, 2004). Determinace pohlaví na základě analýzy DNA je tedy založena na prokázání přítomnosti či absence W chromozomu či jeho specifické sekvence, kdy přítomnost tohoto chromozomu indikuje, zdali vyšetřovaný jedinec je nebo není samičího pohlaví.

3.2.8.1 Určování pohlaví ptáků nadřádu letců

Prvním popsáným genem W chromozomu byl výrazně konzervativní gen *CHDI* (chromobox-helicase DNA binding protein) (Griffiths a Tiwari 1995). Na Z chromozomu je u většiny ptáků lokalizován gen homologní k *CHDI-W* a sice gen *CHDI-Z*. Gen *CHDI* má 37 exonů. Determinace pohlaví ptáků s využitím PCR je založena na amplifikaci homologních sekvencí genů *CHDI-W* a *CHDI-Z*, a to včetně intronu, který má v každém genu (na W a Z chromozomu) rozdílnou délku (Montell et al., 2001). Rozdílná délka intronů rozhoduje o délce PCR produktu, přičemž právě na tomto rozdílu je založena determinace pohlaví PCR metodou. Tato metoda se využívá k rozlišení pohlaví u většiny ptáků s výjimkou nadřádu běžců (*Ratitae*) (Griffiths et al., 1998; Fridolfsson a Ellegren, 2000).

3.2.8.2 Určování pohlaví ptáků nadřádu běžců

Shetty et al. (1999) provedl srovnávací studii pohlavních chromozomů kura domácího (*Gallus domesticus*) a emu hnědého (*Dromaius novaehollandiae*) založenou na metodě FISH (Fluorescent in-situ hybridization). Výsledkem bylo objevení výrazné homologie Z a W chromozomů u emu hnědého a určení možného regionu vhodného k determinaci pohlaví, v centromerní oblasti chromozomu W. Homologie pohlavních chromozomů byla potvrzena i u dalších zástupců běžců, a sice u pštrosa dvouprstého či kasúara přílbového (Ogawa et al., 1998.; Nishida-Umehara et al., 1999). U běžců jsou Z a W chromozomy homomorfní s výjimkou

některých nepatrně odlišných regionů, které jsou úspěšně využívány pro stanovení pohlaví molekulárně genetickými metodami. Na základě analýz byly i přes značnou homologii pohlavních chromozomů vytipovány kandidátní lokusy pro determinaci pohlaví běžců. Jedná se především o gen *DMRT1*. Gen *DMRT1* emu hnědého je z 88 % homologní s *DMRT1* kura domácího a z 65 % s humánním *DMRT1*. Zajímavé je, že 270 bp dlouhý úsek intronu 3 je homologní s analogickým úsekem v lidském genomu (Shetty et al., 2002).

3.3 Laboratorní metody determinace pohlaví ptáků na základě analýzy DNA

3.3.1 Izolace DNA

Izolace je prvním krokem ke všem následným analýzám DNA. Cílem izolace je získání vzorku DNA ze zkoumaného biologického materiálu pomocí kombinací chemických a fyzikálních metod. Získaný vzorek DNA by měl být bez kontaminantů a o koncentraci umožňující další použití DNA. Základními kroky izolačních metod je rozrušení buněk biologického materiálu, rozvolnění jejich obsahu, odstranění kontaminantů a všech složek kromě extrahované DNA (Brown, 2007).

3.3.1.1 Nejčastější izolační metody

V průběhu vývoje molekulárně biologických metod byla vyvinuta spousta metodik izolace DNA, jako např. fenol-chloroformová metoda. V současné době se hodně používají izolační soupravy (kity), které výrazně zjednodušují a urychlují postup získání DNA.

Fenol-chloroformová metoda

Principem fenol-chloroformové izolace DNA je rozdílná rozpustnost DNA ve vodné fázi oproti rozpustnosti ostatních makromolekul a dalších buněčných složek v organické fázi. Smícháním extrakčního pufru se vzorkem je DNA uvolněna do roztoku. Po přidání fenol-chloroformové směsi je DNA rozpuštěna v horní vodné fázi, zatímco proteiny jsou umístěny v interfázi a zbylé buněčné makromolekuly jsou rozpuštěné ve spodní organické fázi. DNA je následně s vodnou fází oddělena a poté

vysrážena pomocí alkoholu a solí z roztoku. Vysrážená DNA je centrifugována a zbylý roztok je odstraněn. DNA je nakonec promyta promývacím pufrem a rozpuštěna v elučním pufru (Sambrook a Russel, 2001).

Silikátové částice

Jedná se o metodu, která využívá afinity pozitivně nabitě silikátové matrice k negativně nabitě kostře DNA za přítomnosti definované koncentrace solí. Silikátová matrice může existovat ve 2 formách, buď ve formě volných silikátových kuliček nebo ve formě silikátové membrány imobilizované v centrifugační kolonce. V případě použití volných silikátových kuliček je vzorek homogenizován v extrakčním pufru, po uvolnění DNA do pufru se přidají silikátové kuličky, na které se naváže DNA přítomná v extrakčním pufru. Kuličky jsou centrifugací sedimentovány na dno zkumavky a extrakční pufr se zbytky buněčného materiálu je odstraněn. Kuličky jsou poté následně několikrát promývány promývacím pufrem. Nakonec je DNA od kuliček uvolněna elučním pufrem do elučního pufru. Principem eluce je snížení koncentrace solí v elučním pufru, čímž dojde k uvolnění DNA od kuliček (Melzak et al., 1996; Esser et al., 2006).

Magnetické částice

Původně se tato metoda dělala ručně, ale v dnešní době se více využívá automatických izolátorů. Jedná se o metodu, která využívá afinity magnetizovatelné celulózy k DNA za přítomnosti definované koncentrace solí. Vzorek je homogenizován v extrakčním pufru, po uvolnění DNA do pufru se přidají paramagnetické kuličky mající afinitu k DNA. Kuličky jsou potažené magnetizovatelnou celulózou, jejíž afinita mimo jiné závisí na koncentraci solí v extrakčním pufru. Po připoutání DNA ke kuličkám jsou kuličky „přitaženy“ k magnetu a extrakční pufr je se zbytky buněčného materiálu odstraněn. Kuličky jsou uvolněny z magnetu a společně s DNA jsou několikrát promyty promývacím pufrem. Po odstranění tohoto pufru je DNA uvolněna elučním pufrem od kuliček a v elučním pufru resuspendována. Poté jsou pomocí magnetického separátoru magnetické kuličky odděleny a eluční pufr s DNA je přenesen do nové zkumavky (Nargessi, 2005).

3.3.1.2 Elektroforéza

Elektroforéza (ELFO) patří k nejvíce využívaným separačním technikám pro analýzu makromolekul DNA, RNA a proteinů v molekulární biologii. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Molekula nukleové kyseliny (NK) se díky záporně nabitě fosfátové skupině pohybuje v elektrickém poli k opačně nabitě elektrodě (anodě) (Brown, 2007).

Gelová elektroforéza

Elektroforetická pohyblivost molekuly NK závisí na velikosti molekuly, přičemž gelová elektroforéza od sebe separuje molekuly na základě rozdílných rychlostí pohybu molekul DNA v gelu, které jsou nepřímo úměrné jejich velikostem. Jako nosič se při gelové elektroforéze používá gel, nejčastěji tvořený z agarózy či polyakrylamidu (PAGE). Strukturu gelu si lze představit jako hustou síť s různě velkými póry, kterou molekuly NK prochází, aby se dostaly k anodě. Čím je molekula NK menší, tím rychleji se gelem pohybuje. Složení gelu se volí dle předpokládané velikosti NK, kdy agarózové gely jsou vhodné pro separaci větších molekul NK, zatímco polyakrylamidové gely lze využít při separaci menších molekul NK či analýze bílkovin. Dalším faktorem pro pohyblivost NK je koncentrace gelu, přičemž se zvyšující se koncentrací agarózy (udávaná v % práškové agarózy), klesá rychlost separace molekul. Pro separaci kratších fragmentů je vhodnější gel o vyšší koncentraci (Jeppson et al., 1979).

Elektroforéza probíhá ve speciálních aparátech, v nichž je nosič (gel) se vzorkem k separaci umístěn mezi dvě elektrody. Gel je ponořen v elektroforetickém pufru (nejčastěji TBE - Tris/Borate/EDTA nebo TAE – Tris/acetate/EDTA), který slouží jako elektrolyt. Mezi elektrodami prochází stejnosměrný proud. Podle způsobu provedení lze gelovou elektroforézu rozdělit na vertikální a horizontální (Brown, 2007).

3.3.1.3 PCR

Polymerázová řetězová reakce se používá k namnožení – amplifikaci specifického úseku DNA v umělých podmínkách (Mullis et al., 1986). Princip metody spočívá v rychlém opakování jednotlivých kroků reakce (cyklování), k čemuž se využívá automatických termocyklérů.

V prvním kroku – denuraci se vlivem vysoké teploty (94 °C), poruší vodíkové můstky, spojující vlákna dvoušroubovice DNA a dojde k jejímu rozvolnění.

Během dalšího kroku (annealing) následuje zchlazení na 50-60 °C, kdy by se obě vlákna každé molekuly opět spojila, avšak většina tak neučiní, protože směs obsahuje primery, které specificky nasedají na komplementární 3' konce cílové DNA. Primery neboli oligonukleotidy, jsou krátké, synteticky připravené jednořetězcové molekuly DNA, jejichž sekvence je komplementární k sekvencím na 3' konci obou vláken úseku DNA, který chceme amplifikovat. Délka primerů je přibližně 20 nukleotidů, přičemž sekvence bází je vždy specifická vzhledem k cílovému úseku DNA.

Posledním krokem je tzv. extenze (elongace), optimálně při 74 °C. V této chvíli enzym *Taq* DNA polymeráza komplementárně k templátovému vlákně DNA připojuje k jednomu konci každého primeru volné nukleotidy a to ve směru od 3' k 5' konci. Výsledkem jsou nově syntetizovaná vlákna DNA, komplementární k templátovým molekulám DNA. Celý cyklus složený ze základních 3 kroků se k získání potřebného množství kopií cílového úseku DNA (amplikonů) opakuje většinou 25 až 30 krát.

Na závěr je obvykle výtěžek PCR ověřen pomocí agaróзовé elektroforézy či je jeho koncentrace a čistota měřena spektrofotometrem. Amplifikát (produkt PCR) o odpovídající čistotě a koncentraci je připraven k následným analýzám. V dnešní době není používána již pouze konvenční PCR, ale bylo vyvinuto i spousta specifických modifikací této metody (Brown, 2007).

3.3.2 Sekvenování

Ke stanovení primární struktury DNA, tedy přesného pořadí nukleotidových bází cílového úseku DNA, se v současné době využívají techniky založené na biochemické (Sangerově) metodě sekvenování. Plně automatizované přístroje (sekvenátory) zajišťují separaci reakčních produktů (detekci), shromáždění dat z reakce a analýzu pořadí bází.

Reakční směs obsahuje purifikovanou molekulu DNA, jejíž sekvence má být stanovena, primer komplementární k počáteční oblasti sekvenovaného úseku DNA,

DNA polymerázu, směs čtyř nukleotidů (2'-deoxyadenosin 5'-trifosfát, dATP; 2'-deoxytymidin 5'-trifosfát, dTTP; 2'-deoxyguanosin 5'-trifosfát, dGTP; 2'-deoxycytidin 5'-trifosfát, dCTP) a čtyř fluorescenčně značených dideoxynukleotidů (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP). Tyto dideoxynukleotidy (ddNTP) nemají na 3' uhlíku ribózy OH skupinu, tudíž se na tento konec nemůže navázat další nukleotid a dochází k terminaci řetězce. Reakce probíhá podobně jako u PCR střídáním 3 kroků – denaturace, annealing a elongace, kdy se z dNTPs syntetizuje nový řetězec DNA, dokud není do řetězce začleněn ddNTP. V tomto okamžiku je syntéza řetězce ukončena a v reakční směsi se tak postupně vytvoří velký počet fragmentů DNA o různé délce. Fragmenty mají na jednom konci primer a na druhém ddNTP. Každý z ddNTPs je specificky fluorescentně označen. Tato fluorescence je odečítána během průchodu kapilárovou elektroforézou, kde jsou jednotlivé fragmenty separovány podle své velikosti. Na základě odečtené fluorescence, potažmo pořadí ddNTPs, je zpracována sekvence zkoumaného úseku DNA (Kočárek, 2004; Brown, 2007).

4 Materiál a metody

4.1 Vzorky

V experimentální části bakalářské práce byly použity vzorky biologického materiálu celkem 5 druhů ptáků, a to kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*), husy domácí (*Anser anser domesticus*), křepelky čínské (*Coturnix chinensis*), holuba domácího (*Columba livia f. domestica*) a pižmovky domácí (*Cairina moschata f. domestica*). V případě kura domácího se jednalo o plemeno česká slepice zlatě kropenatá, zástupci husy domácí byly plemene česká husa a holuba domácího český stavák. Od každého druhu byly vzorky, a sice vzorky peří a stěrů bukální sliznice, odebrány od 3 jedinců, vzhledem k pohlavnímu dimorfizmu s předem známým pohlavím.

4.2 Odběr biologického materiálu

Biologický materiál byl odebírán se souhlasem chovatele. K izolaci DNA byly využity 2 druhy biologického materiálu, a sice stěr buněk bukální sliznice a peří. V obou případech byla nutná asistence chovatele, který zajišťoval odchyt zvířete.

4.2.1 Peří

Pták byl zafixován ve vhodné pozici tak, aby měl znehybněná především křídla a předešlo se případnému zranění. Poté bylo rychlým pohybem vytrženo krycí pero. Následně bylo pero uloženo do předem popsaneho papírového sáčku a uskladněno při pokojové teplotě.

Pro vlastní izolaci DNA se použilo 3-5 mm biologického materiálu odstřiženého sterilními nůžkami z konce brku krycího pera (viz obr. 4).



Obr. 4: Krycí pera: část brku (vlevo od označení) použitá pro izolaci DNA (Dillingerová, 2016)

4.2.2 Stěr bukální sliznice

Ke stěru bukální sliznice byly použity cytologické kartáčky značky Gynobrush Plus firmy Heinz Herenz Hamburg. Během samotného odběru DNA byla potřeba asistence u menších ptáků (křepelka čínská, holub domácí), kdy chovatel zároveň fixoval ptáka a zobák v pozici vhodné pro odběr. Při odběru vzorků od velkých druhů ptáků (husa domácí, pižmovka domácí) se jako nejvhodnější ukázala technika fixace v sedě, kdy odebíraný pták byl položen zády do klína. Poté došlo ke zlidnění ptáka a následnému rozevření zobáku a získání vzorku. Ten byl získán následovně: cytologickým kartáčkem se důkladně stírala vnitřní strana zobáku a povrch jazyka přibližně 10-15 s všemi směry zároveň s otáčením kartáčku kolem jeho osy. Poté byl cytologický kartáček ponechán k uschnutí tak, aby nedošlo ke kontaminaci a uložen do označeného papírového sáčku. Vzorky byly skladovány v pokojové teplotě.

Před vlastní izolací DNA byly kartáčky inkubovány 10 min v mikrozkmavkách v 1,5 ml destilované vody, při pokojové teplotě. Roztok se následně nechal stočit 5 min v centrifuze při maximálních otáčkách. Supernatant byl odstraněn a pelety buněk bukální sliznice byly použity pro následnou izolaci DNA.



Obr. 5: Detail odběru stěru buněk bukální sliznice: křepelka čínská (Dillingerová, 2016)

4.3 Izolace DNA

S cílem porovnat levné metody poskytující výtěžek DNA s kvalitou a čistotou vhodnou pro následné použití pro PCR, byly vybrány následující tři metody:

- Izolace DNA modifikovanou metodou dodecylsíránem sodným (SDS).
- Izolace DNA pomocí cetyltrimethylamoniumbromidu–polyvinylpyrrolidonu (CTAB - PVP).
- Izolace DNA Chelexem 100.

4.3.1 Izolace DNA modifikovanou metodou SDS

Postup probíhal následovně:

- 1) Materiál byl homogenizován ve 100 μ l extrakčního pufru v 1,5 ml mikrokumavce.
- 2) K homogenátu bylo přidáno 300 μ l extrakčního pufru a 5 s se vzorek vortexoval.
- 3) Poté byl extrakt centrifugován 1 min při 13 000 rpm.

- 4) 300 μ l supernatantu bylo přeneseno do nové mikrozkuřavky.
- 5) K supernatantu bylo přidáno 300 μ l isopropanolu vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a směs se nechala 2 min srážet.
- 6) Vzorek byl centrifugován 5 min při 13 000 rpm a poté byl opatrně odstraněn supernatant (pelet zůstal ponechán).
- 7) Osušený pelet byl rozpuštěn ve 100 μ l TE pufru.
- 8) DNA lze uchovat krátkodobě ve $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo po delší dobu v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Složení použitých pufrů:

Extrakční pufr

- 200 mM Tris-HCl (pH=7,5)
- 250 mM NaCl
- 25 mM EDTA
- 5 % SDS

TE pufr

- 10 mM Tris-HCl (pH=7,5)
- 1,0 mM EDTA

4.3.2 Izolace DNA pomocí CTAB - PVP

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod a pro účely AFLP analýzy. Přidání PVP odstraňuje kontaminanty a umožňuje získání čisté a kvalitnější DNA. Metoda je založena na schopnosti CTAB vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson, 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

Postup probíhal následovně:

- 1) Ke každému vzorku biologického materiálu bylo přidáno 500 μ l přehřátého roztoku (65 °C) PVP-CTAB a 1 % merkaptoethanolu. Vzorek byl dokonale homogenizován a poté se nechal 45 min inkubovat při 65 °C. Během inkubace byl každých cca 15 min lehce promícháván.
- 2) Po centrifugaci - 12 000 rpm 10 min byl převeden supernatant (500 μ l) do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek, kam bylo poté přidáno 500 μ l chloroformu s isoamylalkoholem (IAA) v poměru 24:1; směs se dala na 10 min promíchávat a následně 5 min centrifugovat při 12 000 rpm.
- 3) Do nových mikrocentrifugačních zkumavek byla odpipetována vodná fáze, ke které se přidalo 1/5 objemu 5 % CTAB a směs se promíchala, opět se přidalo 500 μ l směsi chloroform-IAA a vzorek se dal na 10 min protřepat. Poté byl vzorek centrifugován 5 min při maximální rychlosti a pokojové teplotě.
- 4) Do nových mikrocentrifugačních zkumavek byla znovu přepipetována vodná fáze, kam se přidaly 2/3 objemu předchlazeného (-20 °C) isopropanolu (přibližně 250 μ l), vzorek byl lehce promíchán a na 30 min (až na noc) uložen do mrazáku (-20 °C).
- 5) Vzorek byl centrifugován 5 min při 4 °C na 14 000 rpm. DNA ve formě peletu byla ponechána v mikrozkuhavce, supernatant odstraněn tak, aby nedošlo k narušení peletu.
- 6) K peletu bylo přidáno 300 μ l 1x TE pufru a vzorek se nechal inkubovat 30-60 min při 37 °C.
- 7) Dále se přidaly 2 objemy (600 μ l) předchlazeného 96 % etanolu (-20 °C), vzorek byl lehce promíchán a uložen minimálně na 30 min, maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA) do -20 °C.
- 8) Vzorky byly 10 min centrifugovány při 4 °C na 14 000 rpm. Supernatant byl odstraněn a k výslednému peletu přidán 1 ml předchlazeného 70 %. Vzorek byl lehce promíchán a centrifugován 2 min na 14 000 rpm při teplotě 4 °C. Po odstranění supernatantu se vzorky nechaly vysušit.
- 9) Dle velikosti peletu (DNA) bylo přidáno 20-200 μ l 1x TE pufru (inkubace 40 min při 37 °C).

Chemikálie:

- Ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- 2x PVP-CTAB extrakční pufr (2 % CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH=8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1 % 2-merkaptoethanol, 1 % PVP - 40 000)
- 2-merkaptoethanol
- 5 % CTAB
- Chloroform-IAA (24:1)
- 1x TE pufr sterilní
- Isopropanol
- 70 % ethanol

4.3.3 Izolace DNA Chelexem 100**Postup probíhal následovně:**

- 1) Příprava zásobního roztoku 5 % Chelexu: Chelex 100 %, ultračistá voda.
- 2) Termoblok byl předehřán na 56 °C.
- 3) Do 1,5 ml mikroskopické zkumavky bylo odpipetováno 100 µl promíchaného Chelexu 5 %.
- 4) Sterilně bylo přeneseno 3 – 5 mm z konce brku do mikroskopické zkumavky. V případě stěru bukové sliznice – bylo 100 µl chelexu 5 % přidáno přímo k peletu buněk.
- 5) Vzorek byl homogenizován.
- 6) Byl přidán 1 µl Proteinázy K (50 mg/ml), směs se krátce zvortexovala a stočila v centrifuze. Poté byl vzorek inkubován 45 min při 56 °C. Mezitím se nechal druhý termoblok předehřát na 98 °C.
- 7) Po inkubaci byly vzorky vortexovány 15 s a poté inkubovány 10 min při 98 °C.
- 8) Poté byly vzorky opět 15 s vortexovány a na závěr byly centrifugovány 5 min při 14 000 rpm.

4.4 Ověření výtěžku a čistoty DNA

Ke změření koncentrace a čistoty získané DNA bylo použito spektrofotometru BioSpec-nano od firmy SHIMADZU. Slepý vzorek byl zvolen dle pufru, ve kterém byla resuspendována DNA. V případě SDS a CTAB izolační metody 1x TE pufr, v případě Chelexu ultračistá voda.

Postup probíhal následovně:

- 1) Po zapnutí přístroje a softwaru byly nanесeny 2 μ l slepého vzorku.
- 2) Postupně byly nanášeny 2 μ l z každého vzorku; každému vzorku byl v programu přiřazen název.
- 3) Výsledkem byla tabulka uložená ve formátu PDF či CSV.
- 4) Vyhodnocovány byly následující parametry: koncentrace (ng/ μ l) a čistota (poměr absorbance OD 260/280 a OD 260/230) DNA.

4.5 PCR

Pro PCR reakci byl využit komerčně dostupný PPP Master Mix od společnosti Top-Bio s následujícím složením: 1x PPP Master Mix (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0,01 % Tween 20, 2,5 mM MgCl_2 , 200 μ M dATP, 200 μ M dCTP, 200 μ M dGTP, 200 μ M dTTP, 2,5 U Taq-Purple DNA polymeráza) a primery od firmy KRД. Pro identifikaci pohlaví ptáků byly použity ověřené primery detekující délkový polymorfismus intronů u genů *CHD1-W* a *CHD1-Z* (Fridolfsson a Ellegren, 1999).

Tab. 2: Složení reakční směsi PCR

Přířady	1 vzorek
PPP Master Mix	12,5 μ l
PCR H ₂ O	9,5 μ l
5' primer	1 μ l
3' primer	1 μ l
templátová DNA	1 μ l

Tab. 3: Sekvence primerů

Název	Sekvence	Finální koncentrace
Forward - 2550F	5'---GTTACTGATTCGTCTACGAGA---3'	10 pmol/μ
Reverse - 2718R	5'---ATTGAAATGATCCAGTGCTTG---3'	10 pmol/μ

Postup probíhal následovně:

- 1) Reagencie byly namíchány dle uvedeného složení reakční směsi v PCR mikrozkuvkách za použití chladicího stojánku.
- 2) Poté byly zamíchány pomocí vortexu a krátce centrifugovány.
- 3) Nakonec byly mikrozkuvky vloženy do termocycleru Bioer za následujících podmínek (viz tab. 4).

Tab. 4: Teplotní profil PCR reakce

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94 °C	1 min	1
Denaturace	94 °C	30 s	touchdown
Nasednutí primerů	60° až 51 °C	30 s	
Extenze	72 °C	45 s	
Denaturace	94 °C	30 s	30 x
Nasednutí primerů	50 °C	30 s	
Extenze	72 °C	45 s	
Finální extenze	72 °C	7 min	1
Chlazení	4 °C	∞	

- 4) Amplifikovaná DNA byla nanášena přímo do agarózového gelu bez přidavku nanášecího pufru.

4.6 Elektroforéza

Na elektroforézu v agarózovém gelu byl použit 3 % agarózový gel.

Materiál a chemikálie:

- elektroforetická aparatura s příslušenstvím, zdroj stejnosměrného proudu
- UV transiluminátor s dokumentačním zařízením
- elektroforetický pufr (10×TBE pufr o složení na 1 litr: 54 g Tris; 27,5 g kyseliny borité; 20 ml 0,5M EDTA, pH 8, 0)
- agaróza
- ethidium bromid (EtBr) 10 mg/ml
- velikostní marker (100 bp ladder)
- PCR produkt
- latexové rukavice

Příprava agarózového gelu:

Na přípravu 200 ml 3 % agarového gelu bylo zapotřebí 6 g práškové agarózy a 200 ml 1×TBE pufru.

- 1) Na analytických vahách bylo naváženo 6 g agarózy, převedeno do Erlenmayerovy baňky a přidáno 200 ml 1×TBE pufru.
- 2) Reagencie byly kroužením krátce promíchány a láhev na cca 3 min vložena do mikrovlnné trouby, dokud nedošlo k dokonalému rozpuštění agarózy.
- 3) Všechny ostatní kroky probíhaly v Biohazard flow boxu.
- 4) Po zchlazení pod tekoucí vodou na cca 60 °C bylo k roztoku přidáno předepsané množství EtBr (10 µl), roztok důkladně promíchán a přenesen do formy na gel tak, aby v gelu nevznikaly bublinky.
- 5) Gel se nechal ztuhnout v dokonale vodorovné poloze.

Složení 1x TBE:

- 54 g Tris-HCl
- 27,5 g kyseliny borité
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- 5 l destilované vody

Nanášení PCR produktu na agarózový gel

Elektroforéza probíhala v 1x TBE pufru za následujících podmínek: 110V/40 až 50 min; bylo použito 10 µl 100 bp ladderu (NEB) a 20 µl vzorku.

Složení 100 bp ladderu (NEB):

- 2,5 % Ficoll-400, 11mM EDTA
- 3,3 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 0,0017 % SDS
- 0,15 % bromofenolová modř

Vizualizace výsledků PCR:

Výsledek byl vizualizován a zdokumentován pomocí fotodokumentačního systému InGenius – Syngene.

5 Výsledky

Izolace DNA byla provedena 3 různými izolačními technikami celkem u 5 druhů ptáků (viz tab. 5). Byly použité vzorky různého data odběru. Cílem bylo porovnat množství a čistotu vyizolované DNA a dle výsledku vybrat nejvhodnější metodu izolace DNA pro použití k determinaci pohlaví ptáků pomocí PCR.

U každého vzorku byla posouzena výsledná koncentrace DNA (ng/μl) a hodnoty OD 260/280 a 260/230. Následně byly vzorky použity pro PCR. Poměr absorbancí při 260 a 280 nm byl použit k posouzení čistoty DNA. Dosahuje-li poměr 260/280 hodnot kolem ~1.8, je vzorek DNA obecně považován za čistý. Jsou-li hodnoty výrazně nižší, může to indikovat přítomnost proteinů, fenolů či jiných kontaminantů absorbujících kolem 280 nm. Poměr 260/230 se používá jako sekundární měření čistoty DNA. Očekávané hodnoty jsou v tomto případě obvykle v rozmezí 2,0-2,2. V případě, že poměr je výrazně nižší, může to znamenat přítomnost kontaminujících látek, které absorbují při 230 nm.

Tab. 5: Seznam odebraných vzorků DNA ptáků (F-samice, M-samec, P – pero, S - stěr)

Vzorek č.	Druh	Pohlaví	Tkáň
1	Husa domácí (<i>Anser anser domesticus</i>)	M	P+S
2	Husa domácí (<i>Anser anser domesticus</i>)	F	P+S
3	Husa domácí (<i>Anser anser domesticus</i>)	F	P+S
4	Husa domácí (<i>Anser anser domesticus</i>)	M	P+S
5	Husa domácí (<i>Anser anser domesticus</i>)	F	P+S
6	Holub domácí (<i>Columba livia f. domestica</i>)	M	P+S
7	Holub domácí (<i>Columba livia f. domestica</i>)	M	P+S
8	Holub domácí (<i>Columba livia f. domestica</i>)	F	P+S
9	Kur domácí (<i>Gallus gallus f. domestica</i>)	F	P+S
10	Kur domácí (<i>Gallus gallus f. domestica</i>)	M	P+S
11	Kur domácí (<i>Gallus gallus f. domestica</i>)	F	P+S
12	Kachna domácí (<i>Anas platyrhynchos f. domestica</i>)	M	P+S
13	Kachna domácí (<i>Anas platyrhynchos f. domestica</i>)	F	P+S

14	Kachna domácí (<i>Anas platyrhynchos f. domestica</i>)	F	P+S
15	Křepelka čínská (<i>Coturnix chinensis</i>)	F	P+S
16	Křepelka čínská (<i>Coturnix chinensis</i>)	F	P+S
17	Křepelka čínská (<i>Coturnix chinensis</i>)	M	P+S

V tabulkách 6 až 11 jsou uvedeny výsledné koncentrace DNA (ng/μl) a hodnoty OD 260/280 a 260/230 naměřené na spektrofotometru BioSpec-nano od firmy SHIMADZU.

Tab. 6: Izolace SDS metodou - krycí peří

Vzorek č.	Koncentrace DNA (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
1	19,2	1,56	0,36
2	52,7	3,62	0,35
3	36,03	1,99	0,2
4	61,37	1,48	0,51
5	69,99	1,4	0,4
6	42,97	1,65	0,35
7	89,69	2,15	1,64
8	205,13	2,42	1,6
9	56,72	2,1	1,73
10	64,35	1,76	0,66
11	38,02	2,35	1,77
12	153,71	1,78	0,69
13	113	1,79	0,74
14	28,35	1,93	1,4
15	19,23	2,15	1,94
16	70,02	2,02	1,96
17	19,82	2,01	1,23

Nejnižší naměřená hodnota koncentrace DNA byla 19,20 ng/μl, zatímco nejvyšší naměřená hodnota byla 205,13 19,20 ng/μl. Čistota DNA: poměry absorbancí 260/280 nabývaly hodnot od 1,40 do 3,62, u 260/230 nabývaly hodnot od 0,20 do 1,96, přičemž optimální hodnoty by měly být kolem 2,0.

Všechny vzorky DNA byly úspěšně použity pro následnou PCR. Vizualizace produktů PCR umožnila determinaci pohlaví u všech vzorků. Průměrná hodnota poměrů absorbancí 260/280 byla 2,01, v případě 260/230 1,03.

Tab. 7: Izolace SDS metodou – stěr bukální sliznice

Vzorek č.	Koncentrace DNA (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
1	85,69	2,15	1,64
2	32,55	2,42	1,6
3	41,78	2,1	1,73
4	116,12	1,76	0,66
5	31,17	2,35	1,77
6	110,43	1,78	0,69
7	72,02	1,79	0,74
8	11,77	1,93	0,4
9	37,83	1,12	0,65
10	51,96	1,68	0,89
11	129,05	0,96	0,78
12	69,99	1,4	1,44
13	2,97	1,65	0,35
14	95,32	1,17	1,23
15	41,86	1,43	0,97
16	72	1,78	1,17
17	64,71	1,67	1,19

Koncentrace DNA dosahovaly hodnot od 129,05 do 2,97 ng/μl. Poměry absorbancí OD 260/280 nabývaly hodnot od 0,96 do 2,42 a parametry 260/230 hodnot od 0,4 do 1,77.

Všechny vzorky DNA byly úspěšně použity pro následnou PCR. Vizualizace produktů PCR umožnila determinaci pohlaví u všech vzorků.

Tab. 8: Izolace metodou CTAB - PVP – krycí peří

Vzorek č.	Koncentrace DNA (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
1	24,69	2,13	2,69
2	129,77	2,13	1,99
3	97,49	1,98	1,71
4	35,56	2,13	1,8
5	16,18	1,09	0,12
6	21,73	1,96	2,39
7	64,74	1,97	2,03
8	37,69	1,57	2,09
9	115,12	1,05	2,24
10	41,82	1,82	1,32
11	74,12	1,91	2,06
12	38,12	1,95	2,22
13	427,41	1,86	1,39
14	78,75	1,16	1,63
15	104,75	1,07	1,98
16	119,74	1,35	1,37
17	41,12	1,02	1,44

Naměřené koncentrace DNA byly v rozmezí 16,18 až 427,41 ng/μl. Parametry OD 260/280 nabývaly hodnot od 1,05 do 2,13 a parametry 260/230 hodnot 0,12 až 2,69.

Všechny vzorky DNA byly úspěšně použity pro následnou PCR. Vizualizace produktů PCR umožnila determinaci pohlaví u všech vzorků.

Tab. 9: Izolace metodou CTAB - PVP – stěr bukání sliznice

Vzorek č.	Koncentrace DNA (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
1	0,24	-0,48	-0,11
2	1,39	5,98	-0,87
3	18,35	2,02	0,54
4	56,99	1,52	1,25
5	15,38	1,63	0,98
6	37,17	1,74	1,18
7	20,48	1,47	1,13
8	37,28	1,29	2,07
9	50,17	1,28	1,31
10	42,29	1,16	1,23
11	19,26	0,78	0,94
12	25,09	1,12	1,12
13	17	1,07	0,79
14	33,62	1,21	1,07
15	29,41	1,02	1,33
16	41,08	1,71	2,03
17	90,17	2,07	1,11

Výsledné koncentrace DNA nabývaly hodnot od 0,24 do 90,17 ng/μl. Poměry absorbance 260/280 byly v rozmezí -0,48 až 5,98, v případě 260/230 -0,87 až 2,07.

Kromě vzorků č. 1 a 2 byly všechny vzorky úspěšně použity pro následnou PCR. Determinace pohlaví ptáků pomocí PCR tedy byla možná, vyjma vzorků 1 a 2.

Tab. 10: Izolace Chelexem 100 - krycí peří

Vzorek č.	Koncentrace DNA (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
1	198,44	1,11	0,48
2	382	1,08	0,62
3	372,58	0,91	0,47
4	1330,01	1,12	0,65
5	672,92	1,76	0,74
6	94,44	1,01	0,62
7	121	0,8	0,21
8	390,48	0,91	0,48
9	317,81	1,02	0,25
10	2110,92	1,6	0,64
11	229,72	0,78	0,19
12	495,53	0,9	0,23
13	500,77	0,85	0,22
14	195,15	1,12	0,23
15	51,79	0,64	0,19
16	91	0,69	0,19
17	92,2	0,68	0,18

Nejnižší naměřená hodnota koncentrace DNA byla 51,79 ng/μl, nejvyšší hodnota pak 2110,92 ng/μl. Poměry absorbancí 260/280 nabývaly hodnot od 0,64 do 1,76 a pro absorbance 260/230 hodnot od 0,18 do 0,74.

Všechny vzorky DNA byly úspěšně použity pro následnou PCR. Vizualizace produktů PCR umožnila determinaci pohlaví u všech vzorků.

Tab. 11: Izolace Chelexem 100 - stěr bukání sliznice

Vzorek č.	Koncentrace DNA (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
1	93,31	1,21	0,28
2	220,39	1,27	0,36
3	108,05	1,19	0,32
4	96,43	1,12	0,28
5	78,58	1,35	0,29
6	66,07	1,06	0,23
7	147,09	1,23	0,31
8	94,68	1,24	0,29
9	82,47	1,17	0,29
10	138,34	1,26	0,3
11	215,78	1,25	0,31
12	170,39	1,28	0,3
13	105,02	1,05	0,24
14	241,38	1,2	0,32
15	174,56	1,2	0,26
16	168,04	0,95	0,22
17	447,18	0,56	0,3

Naměřené koncentrace DNA dosahovaly hodnot od 66,07 do 447,18 ng/μl. Čistota DNA: poměry absorbancí 260/280 nabývaly hodnot od 0,56 do 1,35 a poměry 260/230 hodnot od 0,22 do 0,36.

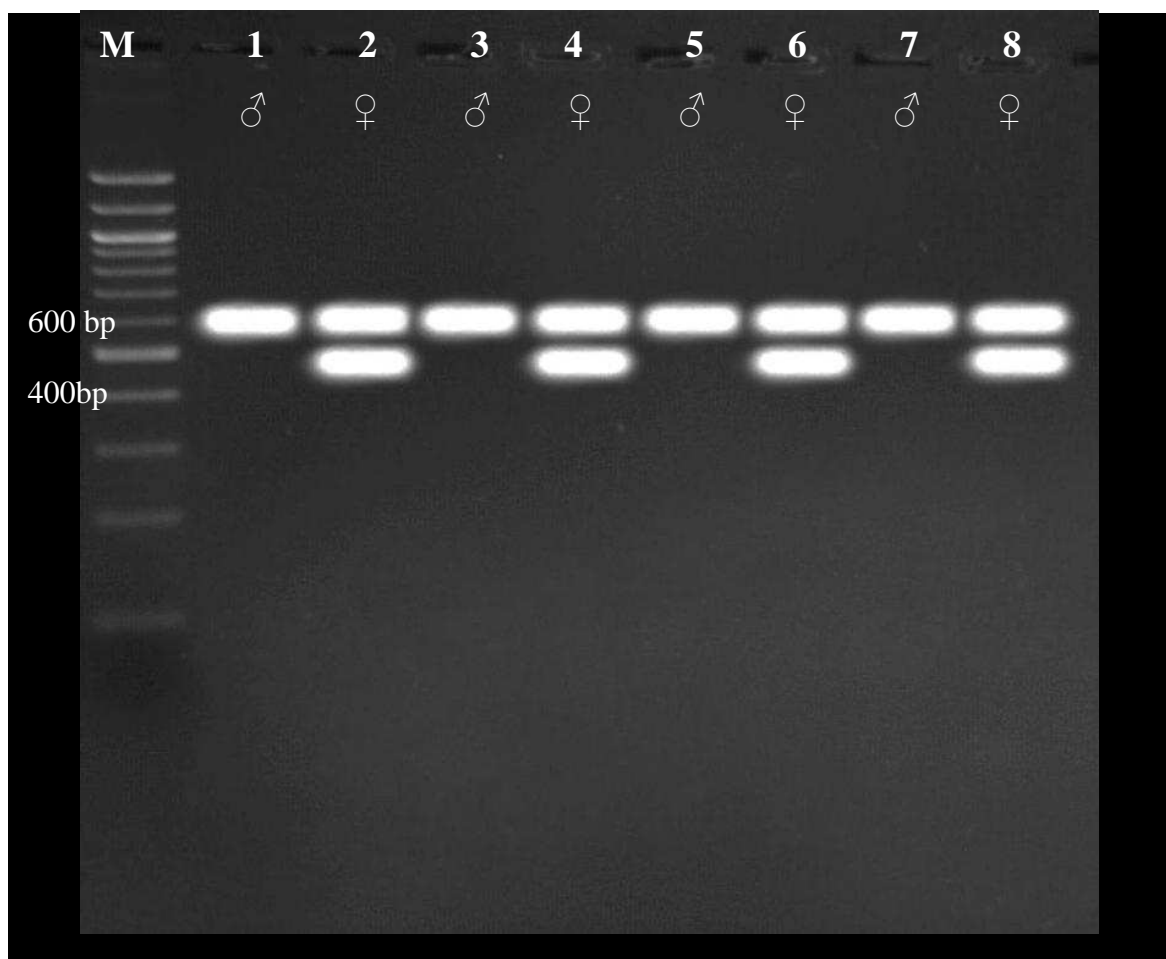
Všechny vzorky DNA byly úspěšně použity pro následnou PCR. Vizualizace produktů PCR umožnila determinaci pohlaví u všech vzorků.

Použitelnost vyizolované DNA byla ověřena pomocí PCR reakce. Vizualizace PCR produktů po elektroforéze na 3 % agarózovém gelu umožnila determinovat pohlaví u všech sledovaných ptáků, kromě vzorku č. 1 a 2 získaných ze stěrů bukální sliznice a izolovaných metodou CTAB – PVP (viz tab. 9). V případě vzorku č. 1 byla koncentrace DNA 0,24 ng/μl, u vzorku č. 2 1,39 ng/μl. Ani při opakovaném provedení PCR se neobjevila pozitivní amplifikační odezva. Neúspěšnou amplifikaci mohla způsobit nízká vstupní koncentrace či kvalita DNA. S přihlédnutím k hodnotám koncentrací ostatních vzorků získaných stěrem bukální

sliznice (viz tab. 7, 9 a 11) se lze domnívat, že nízká koncentrace vzorků č. 1 a 2 (viz tab. 9) byla způsobena pravděpodobně lidským faktorem (např. nepřesným provedením, chybou v pipetování, apod.).

Jako úspěšné se ukázaly izolace SDS metodou a izolace Chelexem 100, protože pomocí těchto dvou metod se nám podařilo vyizolovat všechny vzorky DNA. Vzhledem k úspěšnosti amplifikace 100 % vzorků vyizolovaných pouze metodami SDS a Chelexem 100 nemůžeme tedy doporučit izolaci metodou CTAB-PVP.

Izolaci DNA jak z peří, tak ze stěru bukální sliznice lze doporučit jako vhodnou pro následnou determinaci pohlaví ptáků pomocí PCR. Z hlediska největších výtěžků DNA a zároveň nízké náročnosti jak časové, tak technické, se jako nejlepší ukázala metodika izolace Chelexem 100.



Obr. 6: Vizualizace determinace pohlaví pomocí PCR (M – marker 100bp; 1, 2 – kur domácí; 3, 4 – křepelka čínská; 5, 6 – husa domácí; 7, 8 – kur domácí) (Dillingerová, 2016)

6 Diskuze

S přihlédnutím na welfare ptáků se uvádí, že odběry vzorků biologického materiálu by měly být pro zvíře co nejméně stresující a bolestivé (Russell a Burch, 1959), a proto se přistupuje čím dál častěji k neinvazivním metodám. Existuje řada neinvazivních odběrových metod pro izolaci DNA, a sice odběr peří (Ellegren, 1992; Pearce et al., 1997), drápu (Drummond et al., 1997), stěru buněk bukání sliznice (Handel et al., 2006; Arima a Ohnishi, 2006; Wellbrock et al., 2012), vaskularizované skořápkové (papírové) membrány (Pearce et al., 1997; Kimwele et al., 1998) nebo přímo skořápky (Strausberger a Ashley, 2001). Nicméně v případě skořápkové membrány a skořápky, která se jeví jako nejméně invazivní a tím pádem nejvhodnější, se nejedná o univerzální zdroj DNA, protože ani skořápka, ani skořápková membrána nejsou pro sexing vždy k dispozici. V tomto případě by bylo nutné požádat chovatele, který chce ověřit determinaci pohlaví ze skořápky, aby je sám sesbíral a dodal. Skořápky by musely být před samotnou analýzou speciálně uchovávané, jinak by mohlo dojít k degradaci DNA. Taktéž v odchovu mimo líheň nelze v případě větší skupiny vajec vždy zajistit stoprocentní přiřazení skořápky k danému jedinci

Pro tuto bakalářskou práci byly použity neinvazivní metody odběru (odběr krycího peří, stěr buněk bukání sliznice) z toho důvodu, že při nich není odběr tolik bolestivý, jako v případě invazivní metody (odběr krve) a hrozí minimální riziko komplikací. Na základě vlastních zkušeností z odběru lze konstatovat, že ne vždy je vzorek peří ten nejvhodnější. Konkrétně z důvodů nedostatečného opeření mlád'at a v některých případech i vyšší bolestivosti. Stěr bukání sliznice se dá provést vždy, nicméně u malých ptáků může být tento odběr poměrně stresující, jelikož se musí provádět dostatečně dlouho, aby se i u nejmenších druhů odebralo dostatek buněk pro následnou izolaci DNA.

Stěr buněk bukání sliznice se stává nejen v případě ptáků stále populárnější odběrovou metodou, především pro nízkou invazivnost, malou pracnost a zároveň vysokou efektivitu pro následnou izolaci DNA, jak bylo již publikováno v mnoha předchozích publikacích (Brooks et al., 2003; Oberbauer et al., 2003; Meldgaard et al., 2004).

Krycí peří bylo zvoleno z důvodu snadného získávání vzorků. Především v období růstu pera, kdy je brk vyplněn vazivovou pulpou, byla izolace snadná, jelikož homogenizace materiálu nemusela být tak důkladná, současně za poskytnutí vysokého výtěžku DNA. Příprava vzorku před samotnou izolací spočívá pouze v ustříhnutí koncové části brku, nicméně následně musí být vzorek mechanicky homogenizován. Oproti tomu vzorek stěru buněk bukální sliznice je potřeba před samotnou izolací připravit (10 min inkubace a následně 5 min stáčení), na druhou stranu v případě buněk bukální sliznice není nutná mechanická homogenizace.

Stěr bukální sliznice považuji za další vhodnou neinvazivní metodu, která se dá provést u všech druhů a věkových kategorií ptáků. Handel et al., (2006) uvádí, že během stěru stačí 5 – 10 sekund jemně rotovat sterilním kartáčkem specializovaným na stěr bukání sliznice. Naše závěry jsou takové, že je potřeba otírat bukální sliznici cytologickým kartáčkem delší dobu, a sice doporučených 15 – 20 sekund, jelikož ve dvou případech, kdy byl stěr provázen pouze velmi krátkou dobu, se nepodařilo vyzolovat dostatečné množství DNA. Nicméně v těchto případech nelze stoprocentně vyloučit ani chybu během pipetování. Lze předpokládat, že použití kartáčků specializovaných na odběr buněk bukální sliznice, např. Epicentre (Handel et al., 2006), může zvyšovat konečný výtěžek DNA ve srovnání s kartáčky Gynobrush použitými při této studii.

Marrero et al. (2009) uvádí, že DNA dosahuje optimální čistoty, pokud má poměr absorbancí 260/280 hodnotu 1,8. Khaerunnisa et al. (2013) izoloval DNA z peří a z krve. Ve své studii došel k závěrům, že při použití krve mohou v izolátu DNA přetrvávat rezidua v podobě krevních proteinů a v případě peří keratin. Tataurov et al. (2008) zahrnuje i jiné proteiny a další organické molekuly mezi kontaminanty, které mohou ve svém důsledku inhibovat PCR. Pough et al. (2005) dokládá, že při izolaci DNA z peří 90 % kontaminantů tvoří lipidy, voda, beta kreatin, protein a pigment. Keratin působí často jako inhibitor PCR (Schill, 2007). Z těchto studií vyplývá, že ačkoliv je hodnota poměru absorbancí 260/280 nižší než 1,8, což indikuje nedostatečnou čistotu DNA, tak PCR může proběhnout bez problémů, protože většina kontaminantů nemusí fungovat jako inhibitor PCR. Ačkoliv výsledné hodnoty poměru absorbancí byly nízké, z důvodů přítomnosti kontaminantů v izolátech DNA, tak valná část z těchto kontaminantů pravděpodobně

nepůsobila jako inhibitor PCR, a tím pádem PCR proběhla bez problémů, s dostatečně robustním výsledkem.

U vzorků s příliš nízkou koncentrací DNA PCR neproběhla úspěšně. Je možné, že k chybě došlo již v prvním kroku, tedy odběru DNA, kdy sliznice byla stírána kratší dobu, než je doporučováno. Taktéž je možné, že nízký výtěžek DNA mohl být důsledkem chyby během izolace. Nakonec nelze vyloučit ani chybu v průběhu přípravy reakce PCR. Nicméně vše nasvědčuje selhání lidského faktoru, nikoliv špatné metodice či chybné technice.

Z našich výsledků se jeví jako nejvhodnější metoda izolace Chelexem 100, jedná se totiž o nejlevnější a nejméně pracnou metodu poskytující vysoký výtěžek DNA. Tuto metodu preferují i Adam et al. (2014). Nicméně někteří autoři (Arima a Ohnishi, 2006; Wellbrock et al., 2012) nedosáhli s použitím této metody stejně dobrých výsledků, což mohlo být způsobeno chybou při pipetování templátu do PCR reakce a následnou inhibicí polymerázy (Adam et al., 2014).

7 Závěr

Celkem byla DNA izolována od 17 jedinců, 5 druhů ptáků, ze dvou druhů vzorků biologického materiálu a za použití 3 izolačních technik. Jednalo se tedy o 102 izolací DNA.

Použitelnost vyizolované DNA byla ověřena pomocí PCR reakce. Vizualizace PCR produktů po elektroforéze na 3 % agarózovém gelu umožnila determinovat pohlaví u všech sledovaných ptáků, kromě vzorku č. 1 a 2 získaných ze stěrů bukální sliznice a izolovaných metodou CTAB – PVP (viz tab. 9).

Jak peří, tak stěr bukální sliznice lze vzhledem k dostupnosti a nízké náročnosti odběru doporučit jako vhodný biologický materiál k následné izolaci DNA. Pouze v případě mláďat, kdy není k dispozici peří vhodné pro následnou izolaci DNA, je nutné zvolit jiný biologický materiál. Stěr buněk bukální sliznice je v tomto případě vhodnou alternativou poskytující dobré výsledky.

Vzhledem k tomu, že amplifikace proběhla úspěšně u všech ostatních vzorků, lze izolaci DNA jak z peří, tak ze stěru bukální sliznice doporučit, jako vhodnou pro následnou determinaci pohlaví ptáků pomocí PCR. Stejně tak všechny 3 použité metodiky izolace DNA, tedy modifikovaná SDS metoda, metodou CTAB – PVP a izolace Chelexem 100, se ukázaly jako vhodné pro následující PCR. Z hlediska největších výtěžků DNA a zároveň nízké náročnosti jak časové, tak technické, se jako nejlepší ukázala metodika izolace Chelexem 100.

8 Literatura

Adam I., Scharff C., Honarmand M., 2014. Who is Who? Non-invasive Methods to Individually Sex and Mark Altricial Chicks. *J. Vis. Exp.* 87, e51429.

Andersson M., 1995 *Sexual Selection*. 1. New Jersey, USA: Princeton University Press, ISBN 9780691000572.

Arima H., Ohnishi N., 2006. Usefulness of avian buccal cells for molecular sexing. *Ornithological Science*. 5, 139-143.

Brooks R., Williamson J., Hensley A., Butler E., Touchton G., Smith E., 2003. Buccal cells as a source of DNA for comparative snímál genomic analysis. *Biotechnology Letters*. 25, 451–454.

Brouček J., Benková J., Šoch M., 2011. *Technologie a technika chovu drůbeže při splnění podmínek welfare*. [online]. 1. vyd. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta: NPPC – Centrum výskumu živočišnej výroby Nitra, [vid. 2015-03-24]. ISBN 9788073943370. Dostupné z: <http://www.cvzv.sk/>.

Brown T. A., 2007. Klonování genů a analýza DNA – úvod. Olomouc: nakladatelství UP Olomouc. 389 s. ISBN: 978802441196.

Coyne J. A., Kay E. H., Pruett-Jones S., True J., 2008. The genetic basis of sexual dimorphism in birds. *Evolution*. 62, 214–219.

Drummond P. B., Song Y., Vaughn D., Gbadamosi A., Butler K., Smith E. J., 1997. Isolation of genomic DNA from claw clippings for genetic analysis in chickens. *BioTechniques*. 22, 874–876.

Dubiec A., Zagalska-Neubauer M., 2006. Molecular techniques for sex identification in birds. *Biological Letters*. 43(1), 3 – 12.

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

Esser K. H., Marx W. H., Lisowsky T., 2006. MaxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nature Methods*. 3(1), 1 – 2.

Flegr J., 2009. *Evoluční biologie*. 2. opravené a rozšířené vyd. Praha: Academia. 569 s. ISBN 9788020017673.

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.

Fridolfsson A. K., Ellegren H., 2000. Molecular Evolution of the Avian CHD1 Genes on the Z and W Sex Chromosomes. *Genetics*. 155(4), 1903-12.

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

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

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

Handel C. M., Pajot L. M., Talbot S. L., Sage G. K., 2006. Use of buccal swabs for sampling DNA from nestling and adult birds. *Wildlife society bulletin*. 34(4), 1094–1100.

Jenny J. P., Heinrich W., Montoya A. B., Mutch B., Sandfort C., Hunt W.G., 2004. Progress in restoring the Aplomado Falcon to southern Texas. *Wildl. Soc. Bull.* 32, 276–285.

Jeppson J. O., Laurell C. B., Franzen B., 1979. Agarose gel electrophoresis. *Clin. Chem.* 25, 629-638.

Khaerunnisa I., Sari E., Ulfah M., Jakaria, Sumantri C., 2013. Avian Sex Determination Based on Chromo Helicase DNA-binding (CHD) Genes Using Polymerase Chain Reaction (PCR). *Media Peternakan*. 85-90.

Kimwele C. N., Graves J. A., Burke T., Hanobte O., 1998. Development of microsatellite markers for parentage typing of chicks in the ostrich *Struthio camelus*. *Molecular Ecology*. 7, 249–251.

Kočárek E., 2004. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 1. vyd. Praha: Scientia. ISBN 8071833266.

Kunstmüller I., 2012. Poměr pohlaví mláďat na hnízdech motáka pochopa (*Circus aeruginosus*) v závislosti na velikosti snůšek a pořadí líhnutí. *Crex*. 31, 115-132.

Marerro P., Fregel R., Cabrera V. M., Nogales M., 2009. Ex-traction of high-quality host DNA from feces and regurgi-tated seeds: a useful tool for vertebrate ecological studies. *Biol. Res*. 42, 147-151.

McGibbon W. H., 1977. A sex-linked mutation affecting rate of feathering in chickens. *Poult. Sci*. 56, 872-875.

Meldgaard M., Bollen P. J. A., Finsek B., 2004. Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR. *Laboratory Animals*. 38, 413–417.

Melzak K. A., Sherwood C. S., Turner R. F. B., Haynes C. A., 1996. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *J. Colloid Interface Sci*. 181(2), 635-644.

Montell H., Fridolfsson A. K., Ellegren H., 2001. Contrasting Levels of Nucleotide Diversity on the Avian Z and W Sex Chromosomes. *Molecular Biology and Evolution*. 18(11), 2010-2016.

Murray M. G., Thompson W. F., 1980 Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325.

Neustupa J., 2006. Co je to geometrická morfometrika aneb morfologie znovu na scéně. *Živa. Academia*, 52(2), 54-56.

Nishida-Umehara C., Fujiwara A., Ogawa A., Mizuno S., Abe S., Yoshida M. C., 1999. Differentiation of Z and W chromosomes revealed by replication banding and FISH mapping of sex-chromosome-linked DNA markers in the cassowary (Aves, Ratitae). *Chromosome Res.* 7, 635-640.

Oberbauer A. M., Grossmann D. I., Eggleston M. L., Irion D. N., Schaffer A. L., Pedersen N. C., Belanger J. M., 2003. Alternatives to blood as a source of DNA for large-scale scanning studies of canine genome linkages. *Veterinary Research Communications.* 27, 27-38.

Ogawa A., Murata K., Mizuno S., 1998. The location of Z- and W-linked marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosomes of the ostrich and the emu. *PNAS.* 95(8), 4415-4418.

Pearce J. M., Fields R. L., Scribner K. T., 1997. Nest materials as a source of genetic data for avian ecological studies. *Journal of Field Ornithology.* 68, 471-481.

Piper W. H., Wiley R. H., 1991. Effects of laparotomies on wintering white-throated sparrows and the usefulness of wing chord as a criterion for sexing. *Journal of Field Ornithology.* 62, 40-45.

Platt J. B., 1989. Gyrfalcon courtship and early breeding behavior on the Yukon North Slope. *Sociobiol.* 15, 43-72.

Pough F., Janis Ch. M., Heiser J. B., 2005. *Vertebrate life.* 7. Upper Saddle River, New Jersey: Pearson/Prentice Hall, 2005. ISBN 978-013-1278-363.

Richner H., 1989. Avian laparoscopy as a field technique for sexing birds and an assessment of its effects on wild birds. *Journal of Field Ornithology*. 60, 137–142.

Risser A. C., 1971. A technique for performing laparotomy on small birds. *The Kondor*. 73, 376–379.

Russell W. M. S., Burch, R. L., 1959. *The principles of humane experimental technique*.

Sambrook J. F., Russel D. W., 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Preparation and analysis of Eucaryotic Genomic DNA. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Springs Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5.

Shetty S., Griffin D. K., Graves J. A. M., 1999. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res.* 7, 289-295.

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

Schill R. O., 2007. Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR amplification of mitochondrial genes of tardigrades. *J. Limnol.* 66, 164-170.

Snustad D. P., Simmons J.M., 2009. *Principles of genetics*. 5. vyd. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley and Sons. ISBN 0470398426.

Strausberger B. M., Ashley M. V., 2001. Eggs yield nuclear DNA from egg-laying female cowbirds, their embryos, and offspring. *Conservation Genetics*. 2, 385–390.

Šatava M., Velebil M., Pospíšil P., Procházka O., Rada M., 1984. *Chov drůbeže*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 512 s.

Šmarda J., 2003. *Genetika: pro gymnázia*. 1. vyd. Praha: Fortuna. 143 s. ISBN 8071688517.

Tataurov A. V., You Y., Owczarzy R., 2008. Predicting ultra-violet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophys. Chem.* 133, 66-70.

Vucicevic M., Stevanov-Pavlovic M., Stevanovic J., Bosnjak J., Gajic B., Aleksic N., Stanimirovic Z., 2013. Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biology*. 32(3), 269–276.

Wellbrock A. H. J., Bauch Ch., Rozman J., Witte K., 2012. Buccal swabs as a reliable source of DNA for sexing young and adult Common Swifts (*Apus apus*). *J. Ornithol.* 153, 991-994.

Internetové zdroje

Avian genomics, 2014. *Avian Phylogenomics Project* [online]. Guangzhou: Guangdong ICP, [cit. 2016-04-13]. Dostupné z: <http://avian.genomics.cn/en/>

BackYard Chickens, 2016. *Sex-linked Information* [online]. [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: <http://www.backyardchickens.com/t/261208/sex-linked-information>.

Hy-Line, 2016. *Gender Identification of Chicks* [online]. [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: <http://www.hyline.com/asp/redbook/redbook.aspx?s=3&p=32>.

Patent

Mullis K. M., Erlich H. A., Arnheim N., Horn G. T., Saiki R. K., Scharf S. J., 1986. Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences. USA. US 4683195 A. Přihlášeno 07.02.1986.

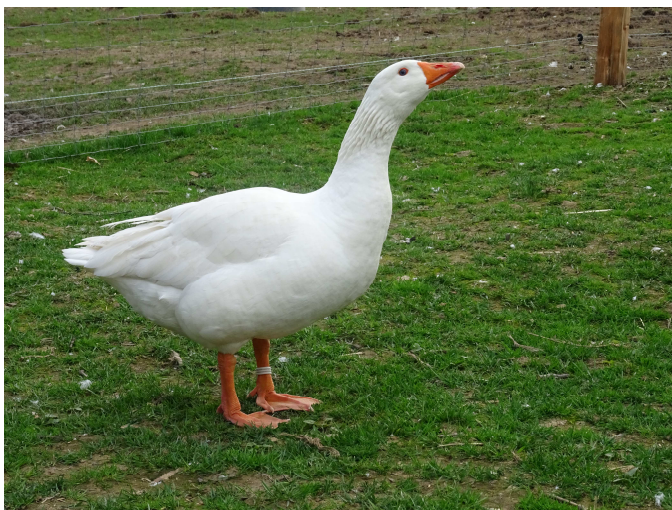
Nargessi R. D., 2005. Magnetic isolation and purification of nucleic acids. Cortex Biochem, Inc. USA. US 6855499 B1.

9 Přílohy

9.1 Obrázky



Obr. 7: Školní statek ZF JU: výběhy: kur domácí (*Gallus gallus f. domestica*), plemeno česká slepice zlatě kropenatá (Dillingerová, 2016)



Obr. 8: Soukromý chov: husa domácí (*Anser anser domesticus*), plemeno husa česká (Dillingerová, 2016)