

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Petra Dolenc, Tanja Šinko

Molekularno određivanje spola ptica  
na temelju razlika CHD-W i CHD-Z gena

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom dr.sc. Ivne Kocijan i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008./2009.

# Kratice

CCh – *Carduelis chloris*, zelendur

CHD gen – chromo-helicase-DNA-binding gene, kromo- helikaza- DNA vezajući protein

CHD-W – CHD gen na W spolnom kromosomu

CHD-Z – CHD gen na Z spolnom kromosomu

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

GF – *Gyps fulvus*, bjeloglavi sup

HAZU – Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti

PA – *Phalacrocorax aristotelis*, morski vranac

PC – *Parus caeruleus*, plavetna sjenica

PCR - polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom

PD – *Passer domesticus*, vrabac

PE – *Psittacus erithacus*, žako

PM – *Passer montanus*, poljski vrabac

PMr – *Parus major*, velika sjenica

SV – *Sturnus vulgaris*, čvorak

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Opća obilježja i morfološko određivanje spola istraživanih ptica.....	1
1.2. Molekularno određivanje spola u ptica .....	4
1.2.1. Spolni kromosomi i CHD gen .....	4
1.2.2. Lančana reakcija polimerazom.....	5
1.2.3. Elektroforeza.....	6
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>7</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>8</b>
3.1. Rad na terenu.....	8
3.1.1. Lov ptica.....	8
3.1.2. Sakupljanje uzoraka pera i krvi.....	9
3.2. Rad u laboratoriju .....	10
3.2.1. Izolacija DNA.....	10
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	10
3.2.3. Elektroforeza.....	11
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>12</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>15</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>19</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>22</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>23</b>

# 1. UVOD

U istraživanju ponašanja i ekologije ptica, a posebice gniježdenja, određivanje spola jedna je od značajnih sastavnica (primjerice odnos spolova u gnijezdu, povezanost spola sa redoslijedom nešenja jaja i dr.). Kod velikog broja ptičjih vrsta prisutan je određeni stupanj razlike među spolovima - spolni dimorfizam (Sutherland i sur. 2004.). Međutim, u većine vrsta s prisutnim spolnim dimorfizmom mogućnost odvajanja spolova prema biometrijskim obilježjima (težina, duljina krila, repa, kljuna i dr.) samo je djelomična jer postoje podudarnosti među spolovima. Rjeđe su vrste s naglašenim spolnim dimorfizmom kod kojih nedvojbeno možemo odrediti spol na temelju vanjskih obilježja (npr. vrabac, kos, divlja patka i dr.). Iako većina vrapčarki (red Passeriformes) i neke vrste ptica iz drugih redova ne pokazuju spolni dimorfizam, ipak među spolovima postoje manje razlike kao primjerice refleksija perja (perje mužjaka izgleda sjajnije) ili tzv. "spolni ornamenti" (npr. deblja crna trbušna pruga u mužjaka velike sjenice). Međutim, kod takvog određivanja spola može doći do problema zbog varijacija među populacijama pa se teško može uopćavati unutar vrste. U doba gniježdenja ženku možemo razlikovati od mužjaka po gubitku perja na trbušnoj strani gdje koža postane jače prokrvljena. Budući da je to samo u razdoblju gniježdenja, takav način određivanja spola ima mnoge nedostatke. U embrija i mladih u gnijezdu vrlo je teško ili nemoguće odrediti spol. U navedenim slučajevima, ako je određivanje spola ključno ili od izrazite važnosti za istraživanje, najbolje je posegnuti za molekularnim metodama određivanja spola. Zbog toga su danas u ornitologiji sve prisutnija istraživanja na molekularnoj razini (npr. Rejt i sur. 2005., Robertson i Gemmell 2006., Wang i sur. 2006., Laucht i sur. 2008., Ong i Vellayan 2008., Lifjeld i sur. 2005.). Međutim, u nas takav pristup još nije zaživio, pa će ovaj rad imati značajan doprinos u ostvarivanju novih spoznaja na području ornitologije u Hrvatskoj.

## 1.1. Opća obilježja i morfološko određivanje spola istraživanih ptica

Za ovo israživanje odabrane su vrste ptica iz reda vrapčarki (Passeriformes) koje su česte u nas: velika sjenica (*Parus major*), plavetna sjenica (*Parus caeruleus*), čvorak (*Sturnus vulgaris*), vrabac (*Passer domesticus*), poljski vrabac (*Passer montanus*) i zelendur (*Carduelis chloris*). Sve vrste su stanarice, a povremeno i skitalice u potrazi za hranom, te su česti posjetitelji hranilišta zimi. Iznimka je čvorak koji je selica. Osim zelendura koji gnijezdi

najčešće u grmlju, sve vrste su dupljašice pa rado ulaze u škrinjice za gniježđenje (umjetne duplje). Osnovni morfološki i biometrijski podaci za istraživane vrste uzeti su prema Heinzelu i sur. (1997.) i Crampu (1998.).

Velika sjenica najčešća je sjenica u Hrvatskoj. Obitava u listopadnim i mješanim šumama, voćnjacima, vrtovima i gradskim parkovima. Velika je 14 cm. Lako je prepoznatljiva po kombinaciji crnobijele glave, plavozelenog perja na leđima i žutog perja na trbušnoj strani te crnog podbratka koji se uzdužno proteže trbušnom stranom. U mužjaka je crna trbušna pruga šira nego u ženke pa ih na taj način možemo razlikovati iako ne postoji naglašeni spolni dimorfizam.

Plavetna sjenica (sl. 1.) česta je u bjelogoričnim šumama, gradskim parkovima i vrtovima. Velika je svega 11,5 cm, a teška 9 do 12 grama. Pretežito je plave i žute boje s karakterističnim svjetloplavim tjemnom. Mužjak i ženka vrlo su slični, ali mužjaka možemo razlikovati od ženke po sjajnijem i intenzivnije plavom perju na glavi, repu i krilima. Ovakvo određivanje spola subjektivno je, a time i podložno pogreškama pa se ne treba isključiti mogućnost pogrešnog određivanja spola na terenu. Biometrijska obilježja previše se podudaraju da bi se spol mogao pouzdano utvrditi (npr. duljina repa u mužjaka je 49-54 mm, a u ženke 47-52 mm).



Slika 1. Plavetna sjenica (*Parus caeruleus*)

Čvorak obitava u šumarcima na ravničarskim poljoprivrednim područjima, u vrtovima, voćnjacima i parkovima. Veličine je 21,5 cm. Perje odraslih jedinki crnkasto je s ljubičastozelenim odsjajem i svijetlim pjegama. Mužjaka i ženku ne možemo razlikovati po

boji perja ili biometrijskim obilježjima zbog podudaranja (npr. težina mužjaka je 70-94 g, a ženke 65-91) ali razlikuju se po boji šarenice koja je u mužjaka tamnosmeđa do crna, a u ženke siva do sivosmeđa.

Vrabac je jedna od najčešćih ptica koja obitava u blizini ljudskih naselja, od seoskih naselja do gradova. Veličine je 14,5 cm. Spolni dimorfizam vrlo je izražen pa sa sigurnošću možemo utvrditi kojeg je jedinka spola. Mužjak ima kestenjast plašt, sivo tjeme i trticu te crno grlo. Ženka je odozgo smeđa, a odozdo sivkaste boje (sl. 2.). Naglašeni spolni dimorfizam čini vrapca vrlo korisnim za ovo istrživanje jer predstavlja kontrolu za rezultate dobivene molekularnim metodama.

Poljski vrabac (sl. 3.) živi na otvorenim šumskim područjima, uz obale rijeka, u vrtovima i parkovima; uglavnom u blizini naselja. Velik je 14 cm. Tjeme mu je kestenjasto, trtica žućkastosmeđa, a na krilu ima dvostruku krilnu prugu. U poljskog vrapca ne postoji spolni dimorfizam pa je mužjaka i ženku nemoguće razlikovati. Zbog toga je molekularno određivanje spola vrlo bitno kod ove vrste.



Slika 2. Ženka vrapca (*Passer domesticus*)



Slika 3. Poljski vrabac (*Passer montanus*)

Zelendur je ptica koja obitava na rubovima šuma, u vrtovima i parkovima; češće na staništima s vazdazelenom vegetacijom nego na listopadnim područjima. Veličine je 14,5 cm. Mužjaka i ženku trebalo bi razlikovati po obojenosti: mužjak je svjetlije, žutozeleno obojan

(najviše na području glave i trbuha), dok je ženka uglavnom maslinasta. Međutim, populacije zelendura uvelike variraju u intenzitetu obojenosti, a i obojenost ženke i jednogodišnjeg mužjaka vrlo je slična te lako može doći do zabune pri određivanju spola. Spol se ne može odrediti na temelju biometrijskih obilježja jer su podudarnosti znatne (npr. krilo mužjaka je 83 – 92 mm, a krilo ženke 81 – 90 mm).

U ovo istraživanje uključene su i tri vrste ptica iz tri različita reda čiji su uzorci pera prikupljeni neovisno od ovog rada: morski vranac (*Phalacrocorax aristotelis*), bjeloglavi sup (*Gyps fulvus*) i afrički sivi papagaj – žako (*Psittacus erithacus*).

Morski vranac (red: Pelecaniformes - veslonoške) naseljava stjenovite obale, ponekad odluta do muljevutih ili pješčanih obala, a gnijezdi na liticama ili stijinama. Cijeli je crno obojen osim na osnovi kljuna i oko oka gdje mu je koža žute boje. Mužjak i ženka vrlo su slični, ali je mužjak u pravilu veći od ženke. Za sigurno utvrđivanje spola jedinki važno je naći pouzdanu metodu molekularnog određivanja spola.

Bjeloglavi sup (red: Falconiformes - sokolovke) najčešći je veći strvinar u regiji, jedini svijetlo obojan: uglavnom svjetlosmečkasto s tamnim perjem na krilima i repu te glavom i vratom prekrivenim bijelim paperjem. U Crvenoj knjizi Hrvatske svrstan je u kategoriju kritično ugroženih gnijezdećih populacija (Radović i sur. 2003.). Redovito gnijezdi još samo na kvarnerskim otocima (Cres, Krk, Prvić, Pag). U ove vrste nema spolnog dimorfizma pa je molekularno određivanje spola od velike važnosti za ornitološka istraživanja (Kocijan i sur. 2006.).

Prirodni areal žakoa (red: Psittaciformes - papige) zapadna je do srednja Afrika (Burnie 2001.). Naseljava većinom nizinske kišne šume, planinske kišne šume, plantaže i obrađene površine ili vrtove. U dijelovima svog areala još uvijek je česta vrsta usprkos ilegalnom hvatanju zbog trgovine kućnim ljubimcima. Mužjak i ženka podjednake su građe i obojenosti pa se spol ne može morfološki odrediti.

## **1.2. Molekularno određivanje spola u ptica**

### **1.2.1. Spolni kromosomi i CHD gen**

Spol ptica je, kao i u većine kralježnjaka, određen postojanjem spolnih kromosoma. Spolni kromosomi najvjerojatnije su nastali postupnom promjenom iz autosoma nekog zajedničkog pretka kralježnjaka (Ellegren 2000.). Za razliku od sisavaca kod kojih je mužjak



heterogametna (XY), a ženka homogametna (XX), u ptica su ženke heterogametni spol (ZW), a mužjaci su homogametni (ZZ). W spolni kromosom znatno je manji od Z spolnog kromosoma, sadrži malo gena, a bogat je konstitutivnim heterokromatinom i repetitivnom satelitskom DNA (Griffiths i sur. 1996.). Takve sekvence ubrzano evoluiraju čak i među srodnim vrstama pa bi njihova uporaba kao markera imala vrlo ograničenu primjenu. Zbog toga su se istraživanja usmjerila pronalasku konzerviranih gena na W kromosomu koji bi bili prisutni kod većine ptica.

Prvi takav otkriveni gen bio je CHD-W gen (chromo-helicase-DNA-binding gene), (Griffiths i Tiwari 1995.). Proteini koje kodira CHD gen imaju ulogu u regulaciji transkripcije na kromatinskoj razini utječući na kondenzaciju kromatina pa je taj gen strogo konzerviran kroz čitav ptičji svijet (Griffiths i Tiwari 1996.). U genomu ptica postoje dvije kopije CHD gena, CHD-Z gen vezan za Z kromosom kojeg imaju i ženke i mužjaci te CHD-W kopija gena vezana za W kromosom kojeg imaju samo ženke. Kodirajuće sekvence oba gena strogo su konzervirane pa su CHD-Z i CHD-W gen jednake veličine te ih je nemoguće razlikovati na gelu nakon elektroforeze (Fridolfsson i Ellegren 1999.). Griffiths i sur. (1998.) su razvili metodu istodobnog umnažanja homolognih dijelova CHD-W i CHD-Z gena reakcijom PCR u prisustvu specifičnih početnica. Početnice se vežu za konzerviranu eksonsku regiju obje kopije gena, te dolazi do umnažanja nekodirajućeg introna koji je u CHD-Z i CHD-W genu različite duljine budući da je intronska regija podložna brzim promjenama i mutacijama. Reakcijom PCR nastaju odsječci CHD-Z i CHD-W gena koji su različite veličine te ih je moguće razdvojiti elektroforezom u gelu. Nakon elektroforeze i bojanja DNA, u gelu su vidljive dvije pruge ako se radi o ženki, a jedna ako se radi o mužjaku. Pomoću ove metode moguće je odrediti spol većini vrsta ptica, uz izuzetak bezgrebenki kod kojih se Z i W kromosomi međusobno morfološki ne razlikuju pa ne postoji niti dimorfizam CHD gena (Ansari i sur. 1988.).

### **1.2.2. Lančana reakcija polimerazom**

Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) je molekularna metoda koja nam omogućuje umnažanje određenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*. Metoda se počela koristiti osamdesetih godina prošlog stoljeća, a prvi su je opisali Mullis i Faloona (1987.). Temelji se na aktivnosti enzima *Taq* polimeraze koji je izoliran iz bakterije *Thermus aquaticus* koja živi u termalnim izvorima te zbog toga ne gubi sposobnost umnažanja DNA na visokim temperaturama. Za provođenje reakcije PCR potrebno je

poznavati redoslijed nukleotida koji omeđuju željeni odsječak DNA na temelju čega se odabire par početnica. Početnice su umjetno proizvedeni oligonukleotidni lanci od kojih je jedan komplementaran 3' kraju odsječka jednog DNA lanca koji se umnaža u reakciji, a drugi 3' kraju drugog lanca tako da svaka prijanja uz jedan lanac i usmjeruje umnažanje regije između njih.

Osim početnica, u reakcijsku smjesu za PCR potrebno je dodati DNA kalup, enzim *Taq* polimerazu, deoksiribonukleotide i pufer u kojem se odvija reakcija s enzimskim kofaktorom magnezijem. Reakcija PCR sastoji se od tri faze: faze denaturacije dvolančane molekule DNA, faze sparivanja početnica i faze produljivanja lanaca. Ponavljajući ove tri faze  $n$  puta, količina DNA se povećava  $2^n$  puta. Nakon 20 ciklusa količina DNA se uveća milijun, a nakon 30 ciklusa milijardu puta.

### **1.2.3. Elektroforeza**

Produkti dobiveni reakcijom PCR razlikuju se veličinom i razdvajaju pomoću elektroforeze u agaroznom gelu. To je standardna metoda koja se koristi za brzu analizu DNA (identifikaciju, razdvajanje, određivanje količine i pročišćavanje), a temelji se na različitoj brzini kretanja molekula DNA različitih veličina u agaroznom gelu pod utjecajem električnog polja. Molekula DNA prirodno je negativno nabijena i u električnom polju se kreće prema anodi. Omjer molekulske mase i naboja molekule je konstantan pa se molekule kroz gel kreću brzinom koja ovisi samo o njihovoj veličini. Molekule manje molekulske mase kreću se brže kroz gel dok se one veće kreću sporije. Na uspješnost elektroforeze utječe i koncentracija agaroze u gelu; veća koncentracija agaroze omogućuje bolje razdvajanje manjih odsječaka DNA dok je manja koncentracija agaroze prikladnija za razdvajanje većih odsječaka DNA. U ovom radu korištena je vrlo visoka koncentracija agaroze (3g/100ml) jer su umnoženi odsječci veliki svega nekoliko stotina parova baza. Osim toga, umnoženi dijelovi CHD-W i CHD-Z gena ne razlikuju se mnogo svojom veličinom pa u slučaju rjeđeg gela ne bi došlo do njihovog vidljivog razdvajanja te bi određivanje spola bilo nemoguće.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi primjenjivost molekularnog određivanja spola, koje se temelji na razlikama CHD gena na Z i W spolnim kromosomima, na neke od naših čestih ptica iz reda vrapčarki (velika sjenica, plavetna sjenica, čvorak, vrabac, poljski vrabac i zelendur) te na tri vrste ptica koje su filogenetski udaljenije od odabranih vrapčarki (morski vranac, bjeloglavi sup i žako).

Specifični ciljevi ovog rada su:

- Za svaku istraživanu vrstu utvrditi koji je od dva korištena para početnica (P2/P8 i 2550F/2718R) prikladniji za ovaj način molekularnog određivanja spola.
- Odrediti spol jedinki umnažanjem ciljne DNA izolirane iz uzoraka pera i uzoraka krvi.
- Usporediti kvalitetu rezultata dobivenih umnažanjem ciljne DNA izolirane iz pera i DNA izolirane iz krvi, te odabrati koji je od dva tipa biološkog materijala prikladniji za daljnja istraživanja.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Rad na terenu

##### 3.1.1. Lov ptica

U siječnju 2009. godine na dvije su lokacije postavljena hranilišta za ptice, na području Mokrica (Hrvatsko zagorje) i Markuševca (Prigorje). Tijekom veljače na tim su lokacijama ptice lovljene pomoću mreža (sl. 4.) i klopki na škrinjicama za gniježđenje (umjetne duplje). Sve ulovljene ptice su prstenovane (prsteni Zavoda za ornitologiju HAZU u Zagrebu), a uzorci krvi i pera uzeti su od šest vrsta reda vrapčarki koje su uključene u istraživanje (tab. 1.). Čvorci su jedina vrsta lovljena pomoću klopki postavljenih na ulaze škrinjica za gniježđenje (sl. 5.). Pera morskih vranaca i žakoa te izolirana DNA bjeloglavih supova dobiveni su u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu (tab. 2.).

Tablica 1. Uzorkovane vrste ptica iz reda vrapčarki (Passeriformes)

PORODICA	VRSTA	OZNAKA	METODA LOVA	TIP UZORKA	BROJ JEDINKI
Paridae	<i>Parus major</i>	PM	mreža	krv i pero	8
	<i>Parus caeruleus</i>	PC	mreža	krv i pero	6
Sturnidae	<i>Sturnus vulgaris</i>	SV	klopka	krv i pero	8
Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	PD	mreža	krv i pero	6
	<i>Passer montanus</i>	PM	mreža	krv i pero	12
Fringillidae	<i>Carduelis chloris</i>	CCh	mreža	krv i pero	12
					UKUPNO: 52

Tablica 2. Uzorci pera i izolirane DNA dobiveni u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu

RED	PORODICA	VRSTA	OZNAKA	TIP UZORKA	BROJ JEDINKI
PELECANIFORMES	Phalacrocoracidae	<i>Phalacrocorax aristotelis</i>	PM	pero	3
FALCONIFORMES	Accipitridae	<i>Gyps fulvus</i>	PC	izolirana DNA	6
PSITTACIFORMES	Psittacidae	<i>Psittacus erithacus</i>	SV	pero	2
					UKUPNO: 11



Slika 4. Zelendur (*Carduelis chloris*) u mreži



Slika 5. Klopka na škrinjici za gniježđenje  
čvorka (*Sturnus vulgaris*)

### 3.1.2. Sakupljanje uzoraka pera i krvi

Pera su uzeta s područja leđa. Od svake ptice uzeta su po tri pera. Donji dio badrljice (scapusa) je odrezan prethodno steriliziranim škalicama i stavljen izravno u pripremljenu Eppendorff tubicu. Krv je sakupljena iz bedrene vene na način da je sterilnom iglom napravljena ubodna rana s koje je kap krvi (oko 10  $\mu$ L) odmah pokupljena pomoću FTA kartice (FTA Classic Card, Whatman BioScience), (sl. 6.). FTA kartice sadrže kemikalije koje uzrokuju lizu stanica, denaturiraju proteine te štite nukleinske kiseline od nukleaza, oksidacije i ultraljubičastog zračenja. Kartica s uzorkom krvi pohranjena je u Eppendorff tubicu. Na ranu je primjenjen kratkotrajni pritisak vatrom da bi se spriječilo stvaranje hematoma te zaustavilo krvarenje prije puštanja. Uzorci krvi i pera pohranjeni su na 4°C do trenutka izolacije DNA.



Slika 6. Uzimanje uzorka krvi poljskog vrapca (*Passer montanus*) s FTA karticom

## 3.2. Rad u laboratoriju

### 3.2.1. Izolacija DNA

DNA iz krvi (na FTA karticama) izolirana je pomoću komercijalno dostupnog kita Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) po prilagođenom protokolu proizvođača. DNA iz baze pera je izolirana pomoću komercijalno dostupnih kitova Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) i QIAamp Mini Kit (QIAGEN). U oba kita izolacija DNA se temelji na metodi isoljavanja kod koje se visokom koncentracijom natrijevog klorida postiže taloženje denaturiranih proteina (Miller i sur. 1988.). Za izolaciju DNA iz pera istovremeno su korištena po tri pera od svake jedinke kako bi se izolirala dovoljna količina DNA.

### 3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Odsječci CHD gena u svakom su uzorku umnažani dva puta: jednom pomoću para početnica P2 i P8 (P2 = 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'; P8 = 5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3', Griffiths i sur. 1998.), te drugi puta pomoću para početnica 2550F i 2718R (2550F = 5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'; 2718R = 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3', Fridolfsson i Ellegren 1999.) Reakcijska smjesa je pripravljena koristeći komercijalno dostupan kit Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, USA) prema uputama proizvođača, uz manje izmjene. Reakcijska smjesa s parom početnica P2/P8

sadržavala je 2,25  $\mu\text{L}$  reagensa Qiagen Master Mix (sastav:  $\text{MgCl}_2$ , dNTP, *Taq* polimeraza), 0,21  $\mu\text{L}$  svake početnice, 4,83  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  i 2  $\mu\text{L}$  izolirane DNA. S parom početnica 2550F/2718R rađena je jednaka reakcijska smjesa. Reakcija PCR rađena je u GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) po programu: početna denaturacija na 95°C tijekom 15 minuta; zatim 45 ciklusa: denaturacija na 94°C tijekom 30 sekundi, prijanjanje početnica na 50°C tijekom 60 sekundi te produljenje DNA na 72°C tijekom 60 sekundi. Završno produljenje lanca trajalo je 10 minuta na 72°C.

### **3.2.3. Elektroforeza**

3 % agarozni gel pripremljen je otapanjem 3 g agaroze u 100 ml TBE pufera (Tris-borat, EDTA) uz dodatak boje za nukleinske kiseline SYBRSafe (Invitrogen Molecular Probes) koncentracije 0,2  $\mu\text{L}/\text{ml}$ . U svaku jažicu gela nanosena je smjesa 7  $\mu\text{L}$  PCR produkta i 3  $\mu\text{L}$  pufera za nanošenje uzoraka u gel. Elektroforeza se provodila na 90 V u trajanju od 60 minuta, u TBE puferu. PCR produkti su promatrani pod ultraljubičastom svjetlošću transiluminatora te fotografirani pomoću uređaja za snimanje agaroznih gelova.

## 4. REZULTATI

Uspješno je određen spol 63 jedinke, predstavnice 9 vrsta ptica iz 4 različita reda (tab. 3.). U velike sjenice, čvorka i vrapca, spol određen molekularnom metodom se podudara sa spolom određenim na terenu na temelju morfoloških karakteristika. U plavetne sjenice, za jednog morfološki određenog mužjaka molekularnom metodom je utvrđeno da se radi o ženki. U zelendura je za jednu morfološki određenu ženku molekularnom metodom utvrđeno da je mužjak. Ostalim vrstama spol nije određen na temelju vanjskih obilježja.

Tablica 3. Odnos spolova istraživanih vrsta određen prema morfološkim obilježjima i određen molekularnim metodama

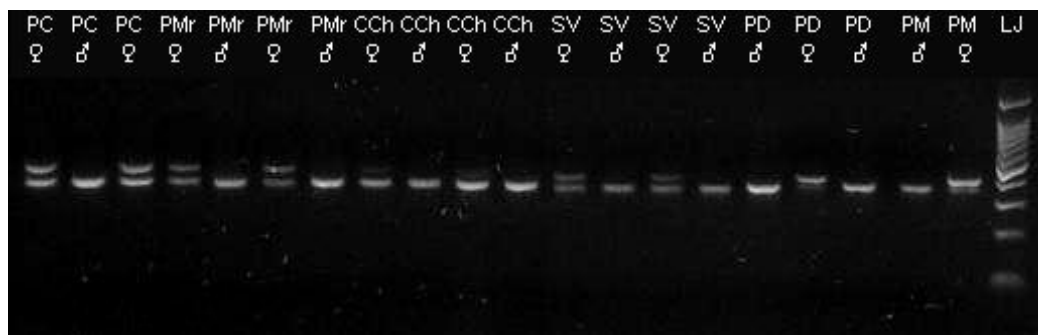
RED	PORODICA	VRSTA	OZNAKA	SPOL ♀/♂	
				morfološki određen	molekularno određen
PELECANIFORMES	Phalacrocoracidae	<i>Phalacrocorax aristotelis</i>	PA	-	2/1
FALCONIFORMES	Accipitridae	<i>Gyps fulvus</i>	GF	-	3/3
PSITTACIFORMES	Psittacidae	<i>Psittacus erithacus</i>	PE	0/2	1/1
PASSERIFORMES	Paridae	<i>Parus major</i>	PM	2/6	2/6
		<i>Parus caeruleus</i>	PC	3/3	4/2
	Sturnidae	<i>Sturnus vulgaris</i>	SV	3/5	3/5
	Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	PD	2/4	2/4
		<i>Passer montanus</i>	PM	-	7/5
Fringillidae	<i>Carduelis chloris</i>	CCh	6/6	5/7	
				Ukupno: 42	Ukupno: 63

### Usporedba početnica

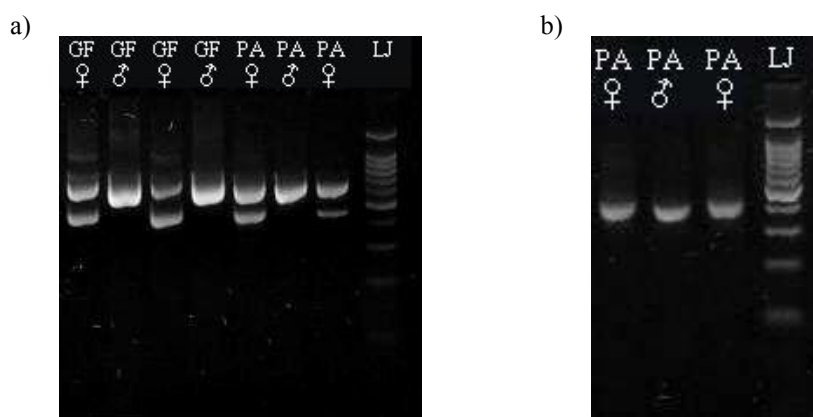
S početnicama P2/P8 uspješno je određen spol svih vrapčarki. Kod ženki su se vidjele dvije pruge u gelu, a kod mužjaka jedna pruga (sl. 7.). U vrsta bjeloglavi sup, morski vranac i afrički sivi papagaj, s istim početnicama dobivena je jedna pruga u gelu za sve jedinke uslijed čega određivanje spola nije bilo moguće (sl. 8.b i sl. 9.).

Korištenjem para početnica 2550F/2718R dobiveni su obrnuti rezultati: u supa, morskog vranca i afričkog sivog papagaja moglo se razlikovati ženku od mužjaka jer su se jasno vidjele dvije odnosno jedna pruga u gelu (sl. 8.a i sl. 9.), dok su sve vrapčarke s ovim početnicama pokazivale samo jednu prugu u gelu (npr. *P. caeruleus*, sl. 9.).

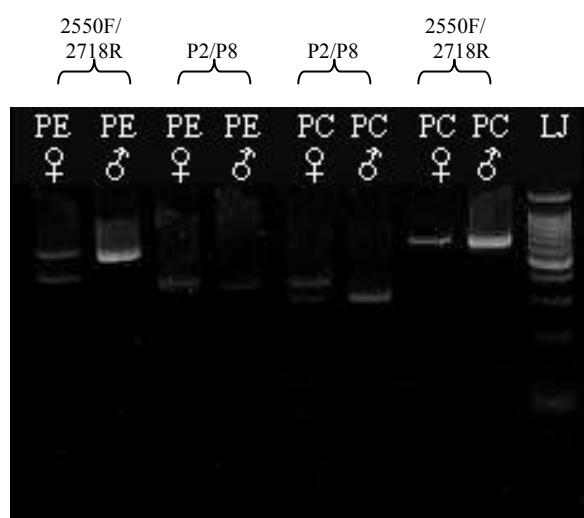




Slika 7. Rezultati dobiveni reakcijom PCR s parom početnica P2/P8 u vrsta iz reda vrapčarki (*Parus caeruleus*–PC, *Parus major*–PMr, *Carduelis chloris*–CCh, *Sturnus vulgaris*–SV, *Passer domesticus*–PD, *Passer montanus*–PM). LJ je biljeg molekulske težine.



Slika 8. Rezultati dobiveni reakcijom PCR: a) s parom početnica 2550F/2718R u bjeloglavog supa (*Gyps fulvus* – GF) i morskog vranca (*Phalacrocorax aristotelis* – PA); b) s parom početnica P2/P8 u morskog vranca (PA). LJ je biljeg molekulske težine.



Slika 9. Usporedni prikaz rezultata dobivenih korištenjem dvaju različitih parova početnica (2550F/2718R i P2/P8) za iste jedinice vrste *Psittacus erithacus* (PE) i *Parus caeruleus* (PC). LJ je biljeg molekulske težine.

### **Rezultati usporedbe izolacije pera i krvi**

DNA morskih vranaca, bjeloglavih supova i žakoa izolirana je samo iz pera, dok je DNA vrapčarki izolirana iz krvi i iz pera. Svi uzorci DNA izolirani iz krvi davali su vidljive rezultate na gelu nakon PCR-a kao i uzorci DNA izolirani iz pera morskog vranca, bjeloglavog supa, žakoa i čvorka. Za uzorke DNA izolirane iz pera velike sjenice, plavetne sjenice, vrapca, poljskog vrapca i zelendura bilo je potrebno napraviti dodatnu reakciju PCR koristeći pritom dobivene PCR produkte, jer je nakon prvih 45 ciklusa vidljivost PCR produkata u gelu bila isuviše slaba da bi se sa sigurnošću mogao odrediti spol. Nakon ponovljene reakcije PCR dobro su se vidjele pruge na gelu i mogao se odrediti spol i u tih vrsta.

U svih jedinki kod kojih je DNA izolirana i iz krvi i iz pera dobiveni su isti rezultati za oba tipa uzorka.

## 5. RASPRAVA

Velikom broju ptičjih vrsta vrlo je teško pa čak i nemoguće odrediti spol na temelju vanjskih obilježja. Veliki je problem i određivanje spola embrija i mladih ptica u gnijezdu kod kojih u pravilu nema spolnog dimorfizma. Čak i kod vrsta kod kojih postoji neka specifična sekundarna spolna karakteristika ili razlika u biometrijskim obilježjima često postoji određeni stupanj preklapanja što dovodi do mogućnosti pogrešnog određivanja spola (Sutherland i sur. 2004.).

U vrapca se molekularno određen spol jedinki podudara s morfološki određenim spolom, što se i očekivalo zbog naglašenog spolnog dimorfizma ove vrste. U velike sjenice i čvorka rezultati morfološkog i molekularnog određivanja spola također su se podudarali. Iako u tih vrsta ne postoji izraziti spolni dimorfizam, ženku od mužjaka možemo razlikovati na temelju manjih morfoloških razlika (čvorak – šarenica oka; velika sjenica - trbušna pruga). U plavetne sjenice spol je prilikom ulova određen na temelju razlike inteziteta i sjaja plavog perja na glavi, repu i krilima (u mužjaka je perje intenzivnije plavo). Budući da je određivanje spola na taj način podložno subjektivnosti istraživača, došlo je do očekivane moguće greške: pogrešno je određen jedan mužjak za kojeg je molekularnom analizom ustanovljeno da je ženka. U zelendura je također došlo do nepodudarnosti rezultata molekularnog određivanja spola i morfološki određenog spola u jedne jedinke. Morfološki određena ženka ispala je mužjak molekularnom analizom. Spol je određivan na temelju žutozeleno obojanog perja koje u mužjaka prekriva znatno veću površinu tijela nego u ženke. U ovom se slučaju vjerojatno radilo o jednogodišnjem mužjaku koji još nema intenzivno žutozeleno obojano perje kao stariji mužjaci pa ga je lako zamijeniti za ženku. Upravo zbog ovakvih pogrešaka, u istraživanjima gdje je određivanje spola ključno ili od izrazite važnosti, pouzdanije je koristiti molekularne metode određivanja spola od morfoloških.

### **Usporedba rezultata dobivenih različitim parovima početnica**

Prema Fridolfssonu i Ellegrenu (1999.) par početnica 2550F/2718R može se koristiti za određivanje spola svih ptičjih vrsta osim bezgrebenki. U našem istraživanju pomoću tog para početnica mogao se odrediti spol morskog vranca, bjeloglavog supa i žakoa. U ženki tih

vrsta jasno su se vidjele odvojene dvije pruge, a u mužjaka jedna pruga (sl. 8.a i sl. 9.). Međutim, u šest vrsta ptica iz reda vrapčarki par početnica 2550F/2718R nije davao zadovoljavajuće rezultate jer je u oba spola dobivena samo jedna pruga u gelu (sl. 9.). Razlog nepostojanja druge pruge u ženki mogao bi biti taj da u lančanoj reakciji polimerazom uopće nije došlo do umnažanja odsječka CHD-W gena. (Fridolfsson i Ellegren 1999.). Postoji mogućnost da je slijed nukleotida na mjestu prijanjanja početnica za CHD-W gen u toj mjeri promijenjen u ovdje istraživanih vrsta iz reda vrapčarki u odnosu na ostala tri reda u kojima je taj odsječak uspješno umnožen, da ne dolazi do prijanjanja početnica a time niti do umnažanja odsječka. Ovakva mogućnost bi se mogla provjeriti sekvenciranjem i usporedbom dobivenih DNA sekvenci. Drugi mogući razlog nepostojanja dvije pruge u ženki iz reda vrapčarki je nedovoljna razlika u duljini umnoženih CHD-W i CHD-Z odsječaka, uslijed čega ih nije moguće razdvojiti elektroforezom u agaroznom gelu (Griffiths i sur. 1998.). Ovu mogućnost bi trebalo ubuduće provjeriti elektroforezom u gelu s većom moći razlučivanja, kao što je poliakrilamidni gel (Dawson 2001.). Također, postoji mogućnost uporabe restrikcijskog enzima ako u umnoženim odsječcima CHD-W i CHD-Z gena postoje različita restrikcijska mjesta, čime bi se otkrile njihove razlike i omogućilo određivanje spola (Sacchia i sur. 2004.).

Jednako kao i Fridolfsson i Ellegren za par početnica 2550F/2718R, Griffiths i sur. (1998.) na temelju svojih rezultata zaključuju da bi par početnica P2/P8 trebao biti jedinstven za sve vrste ptica osim bezgrebenki. S parom početnica P2/P8 u ovom su radu dobiveni rezultati obrnuti od onih s parom početnica 2550F/2718R; u morskog vranca, bjeloglavog supa i žakoa na gelu se vidi samo jedna pruga kod oba spola (sl. 9.) dok su kod svih istraživanih vrsta iz reda vrapčarki na gelu dobivene dvije pruge u ženki, a jedna pruga u mužjaka (sl. 7.). Nepostojanje druge pruge u ženki morskog vranca, bjeloglavog supa i žakoa nakon lančane reakcije polimerazom s ovim početnicama vjerojatno je također posljedica ili neumnažanja CHD-W odsječka ili nedovoljne razlike u duljini CHD-W i CHD-Z odsječaka.

Navedene razlike u rezultatima, dobivene korištenjem dvaju različitih parova početnica, možemo objasniti filogenetskom udaljenošću reda vrapčarki od preostala tri istraživana reda (Pelecaniformes, Falconiformes i Psittaciformes).

U ženki morskog vranca, bjeloglavog supa, žakoa, velike sjenice, plavetne sjenice i čvorka jasno su se vidjele obje pruge koje su bile jednake ili približno jednake debljine. Također je na gelu jasno bilo vidljivo da je CHD-Z pruga kod početnica 2550F/2718R iznad pruge s CHD-W odsječkom, tj. da je u tom slučaju odsječak CHD-W gena dulji od CHD-Z

odsječka, dok je kod početnica P2/P8 CHD-W pruga iznad CHD-Z pruge što znači da se tim početnicama dobivaju odsječci CHD-W gena kraći od CHD-Z odsječka. U ženki obje vrste vrapca pruga CHD-W odsječka deblja je i naglašenija od CHD-Z pruge. Mogući uzrok tome je veći afinitet početnica P2/P8 za CHD-W gen (Griffiths 1998). Međutim, čak i kada je CHD-Z pruga ženki jedva primjetna, spol se pouzdano može odrediti na temelju različitih duljina CHD-Z i CHD-W odsječaka (sl. 7.). Stoga je u istraživanjima vrapca i poljskog vrapca u kojima je bitno određivanje spola preporučljivo u gelu uvijek imati pozitivnu kontrolu za oba spola. Budući da je izgled pruga u gelu u obje vrste vrapca jednak, u istraživanjima poljskog vrapca (kod kojeg ne postoji morfološka razlika između mužjaka i ženke) možemo koristiti uzorke DNA oba spola vrapca kao pozitivne kontrole jer je u njega naglašen spolni dimorfizam. U ženki zelendura CHD-Z pruga deblja je i naglašenija što znači da je u ove vrste afinitet početnica P2/P8 veći za CHD gen na Z kromosomu (sl. 7.). U zelendura bi, za razliku od vrapca, moglo doći do pogrešnog određivanja spola ukoliko se dogodi da je CHD-W pruga izrazito slabo primjetna jer je naglašena CHD-Z pruga ženke jednaka CHD-Z prugi mužjaka. Na slici gela vidljivo je da se odsječak CHD-W gena ženke zelendura slabije umnaža od odsječka CHD-Z gena (pruga je slabijeg intenziteta), ali je dovoljno vidljiv da se može odrediti spol. Unatoč tome, ponovljen je PCR s PCR produktima (ukupno 90 PCR ciklusa) da bi se sa što većom sigurnošću odredio spol jedinki. Potvrđeni su prethodno dobiveni rezultati. Da bi se izbjegao ovaj problem, u budućim istraživanjima zelendura u kojima je određivanje spola od izrazite važnosti, valjalo bi dizajnirati par početnica specifičan za vrstu.

### **Usporedba rezultata dobivenih iz izolata DNA iz krvi i izolata DNA iz pera**

Do danas je najčešća metoda prikupljanja genetičkog materijala za određivanje spola u ptica bila uzimanje uzoraka krvi ulovljenih ptica ili mladih u gnijezdu jer je krv izrazito bogat izvor DNA zbog prisutnosti jezgre u eritrocitima ptica (Harvey i sur. 2005.). U posljednje vrijeme teži se što manje invazivnim metodama uzimanja uzoraka za izolaciju DNA. Izolacija DNA iz uzorka pera ptice jedna je od takvih metoda (Ong i Vellayan 2008.). Uzimanje uzorka pera traje vrlo kratko, a postupak je jednostavan i manje stresan za pticu. Pritom se uzimaju isključivo konturna pera, nikako letna ili repna pera koja su ptici bitna u letenju i kontroli leta. Osim toga, za prikupljanje uzoraka pera nije potrebna stručna osoba. Nadalje, ovaj tip uzoraka otvara mogućnost ne samo određivanja spola već i zahtjevnijih genetičkih analiza DNA iz

uzoraka odbačenih pera, čime se u potpunosti isključuje potreba hvatanja ptica, što je posebno važno u istraživanjima rijetkih i/ili ugroženih vrsta (Horváth i sur. 2005.). Nedostatak izolacije DNA iz pera je taj što se na bazi badrljice nalazi mala količina tkiva pa je, u usporedbi s količinom DNA koja se dobije iz uzorka krvi, količina DNA izolirana iz uzorka pera znatno manja. U ovom istraživanju dobiveni su dobri rezultati iz uzorka pera od morskog vranca, bjeloglavog supa, žakoa i čvorka. Razlog tomu je veličina pera navedenih vrsta te s tim u vezi veća količina tkiva na badrljici. Za ostale istraživane ptice, koje su manjih dimenzija, ponavljao se PCR s već dobivenim PCR produktima (ukupno 90 ciklusa) nakon čega su se pruge na gelu puno bolje vidjele što ukazuje na to da je količina izolirane DNA iz tih malih pera bila nedovoljna. Može se očekivati da bi se bolji rezultati dobili i samo jednom reakcijom PCR kad bi se DNA izolirala iz više od tri pera koliko smo mi koristili.

## 6. ZAKLJUČAK

Metoda molekularnog određivanja spola pokazala se pouzdanijom od određivanja spola jedinki na temelju njihovih vanjskih obilježja kod vrsti ptica u kojih je spolni dimorfizam slabo izražen. Također, ta je metoda od velike važnosti i u istraživanjima vrsta koje uopće ne pokazuju spolni dimorfizam, kao i u istraživanjima u kojima je potrebno određivanje spola embrija u jajima, mladih ptica u gnijezdu ili juvenilnih primjeraka.

Usporednim radom s dva različita para početnica dobiveni rezultati pokazali su da je par početnica P2/P8 odgovarajući za svih šest istraživanih vrsta iz reda vrapčarki pa se može pretpostaviti da bi mogao odgovarati za sve vrste tog reda. Unatoč tome, preporučujemo da se za svaku vrstu ptice, kod koje ova metoda određivanja spola još nije rađena, prije istraživanja provjeri metodologija. Par početnica 2550F/2718R bio je odgovarajući za preostala tri istraživana reda (Pelecaniformes, Falconiformes i Psittaciformes). Iz rezultata možemo zaključiti da se metode korištene u ovom radu s odgovarajućim parom početnica mogu upotrijebiti i u budućim istraživanjima vrsta koje smo mi istraživale: velike sjenice (*Parus major*), plavetne sjenice (*Parus caeruleus*), čvorka (*Sturnus vulgaris*), vrapca (*Passer domesticus*), poljskog vrapca (*Passer montanus*), zelendura (*Carduelis chloris*), morskog vranca (*Phalacrocorax aristotelis*), bjeloglavog supa (*Gyps fulvus*) i žakoa (*Psittacus erithacus*).

DNA je uspješno izolirana iz oba tipa prikupljenih uzoraka: iz krvi i iz pera. Međutim, u manjih vrsta ptica (sjenica, vrabaca i zelendura) količina DNA izolirana iz pera bila je vrlo mala pa je kod nekih uzoraka bilo potrebno ponavljati PCR s PCR produktima. Na taj je način dobivena dovoljna količina PCR produkata za vizualizaciju u gelu i određivanje spola. Ubuduće bi se taj problem mogao riješiti uzimanjem većeg broja pera (više od tri) u ptica manjih dimenzija.

## ZAHVALA

Zahvaljujemo svojoj mentorici dr.sc. Ivni Kocijan na vodstvu i podršci pri izradi ovog rada. Zahvaljujemo udruzi „Animalia“ na uzorcima pera morskog vranca, gđi. Gordani Pavoković na uzorcima pera žakoa i eko-centru „Caput insulae Beli“ na uzorcima pera bjeloglavog supa. Prof.dr.sc. Miloradu Mrakovčiću zahvaljujemo na susretljivosti prilikom terenskog rada. Zahvaljujemo dr.sc. Damjanu Franjeviću na pomoći u fotografiranju gelova.



## 7. LITERATURA

- Ansari, H., Takagi, N., Sasaki, M. (1988.): Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenetical Cell Genetics* 47: 185-188.
- Burnie, D. (2001.): Životinje. Mozaik knjiga, Zagreb.
- Cramp, S. (1998.): Complete Birds of the Western Palearctics on CD-ROM. *Oxford University Press*, New York.
- Dawson, D.A., Darby, S., Hunter, F.M., Krupa, A.P., Jones, I.L., 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.
- Ellegren, H. (2000.): Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 188-192.
- Fridolfsson, A.K. i Ellegren, H. (1999.): A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.
- Griffiths, R. i Tiwari, B. (1995.): Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature* 375: 454.
- Griffiths, R., Dann, S., Dijkstra, C. (1996.): Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 263: 1249-1254.
- Griffiths, R. i Tiwari, B. (1996.): Avian CHD genes and their use in methods for sex identification in birds. *International patent publication no. WO9639505*, published 12 December 1996, Isis Innovation, Oxford.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K., Dawson, R.J.G. (1998.): A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Harvey, M.G., Bonter, D.N., Stenzler, L.M., Lovette, I. (2006.): A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *Journal of Field Ornithology* 77(2): 136-140.
- Heinzel, H., Fitter, R., Parslow, J. (1997.): Ptice Hrvatske i Europe. Hrvatsko ornitološko društvo, Zagreb.

- Horváth, M.B., Martinez-Cruz, B., Negro, J.J., Kalmár, L., and Godoy, J.A. (2005.): An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of avian biology* 36: 84-88
- Kocijan, I., Nenadić, D.D., Sušić, G., Đuras Gomerčić, M., Galov, A., Tadić, Z., Bašić, I. (2006.): Određivanje spola u vrste bjeloglavi sup (*Gyps fulvus*; Hablizl, 1783.) lančanom reakcijom polimeraze (PCR). 9. Hrvatski biološki kongres, Zbornik radova.
- Laucht, S., DuVal, H., Kempnaers, B. (2008.): Maternal correlates of brood sex variation in the lekking lance-tailed manakin *Chiroxiphia lanceolata*. *Journal of Avian Biol.* 39: 198-205.
- Lifjeld J.T., Johnsen, A., Petitguyot, T. (2005.): Egg-size variation in the bluethroat (*Luscinia s. svecica*): constraints and adaptation. *Journal of Ornithology* 146: 249-256.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988.): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research* 16: 1215.
- Ong, A.H.K., Vellayan, S. (2008.): An evaluation of CHD-Specific primer sets for typing of birds from feathers. *Zoo Biology* 27: 62-69.
- Radović, D., Kralj, J., Tutiš, V., Čiković, D. (2003.): Crvena knjiga ugroženih ptica Hrvatske. Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja, Zagreb.
- Rejt, L., Gryczynska- Siemiatkowska, A., Rutkowski, R., Malewska, A. (2005.): Does egg sex ratio in urban kestrels (*Falco tinnunculus*) differ from parity? *Polish Journal of Ecology* 53: 545-552.
- Robertson, B.C. i Gemmell, N.J. (2006.): PCR-based sexing in conservation biology: Wrong answers from an accurate methodology? *Conservation Genetics* 7: 267-271.
- Sacchia, P., Sogliaa, D., Maionea, S., Meneguza, G., Camporab, M., Raseroa R. (2004.): A non-invasive test for sex identification in Short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). *Molecular and Cellular Probes* 18: 193-196.
- Sutherland, W.J., Newton, I., Green, R.I. (2004.): Bird ecology and conservation. *Oxford University Press Inc.*, New York.

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

**Petra Dolenc, Tanja Šinko:**

## Molekularno određivanje spola ptica na temelju razlika CHD-W i CHD-Z gena

### **Sažetak**

Određivanje spola bitno je u istraživanjima ponašanja i ekologije ptica te u strategijama očuvanja ugroženih ptičjih vrsta i njihovom uzgoju u zatočeništvu. Međutim, kod velikog broja vrsta, a naročito u jaja i mladih u gnijezdu, vrlo je teško ili čak nemoguće odrediti spol na temelju vanjskih obilježja. U takvim je slučajevima najbolje posegnuti za molekularnim metodama određivanja spola koje se temelje na razlikama molekule DNA među splovima. Korištena metoda određivanja spola zasniva se na razlikama introna visoko konzerviranog CHD gena na Z i W spolnim kromosomima. Budući da su u ptica mužjaci homogametni (ZZ), a ženke heterogametne (ZW), nakon umnažanja CHD gena lančanom reakcijom polimerazom (PCR) sa specifičnim parom početnica, spolove možemo razlikovati elektroforezom u agaroznom gelu zbog različite pokretljivosti umnoženih CHD-Z i CHD-W odsječaka. Primjenjivost molekularne metode određivanja spola ispitana je na devet vrsta ptica iz četiri različita reda (Pelecaniformes, Falconiformes, Psittaciformes i Passeriformes), ukupno 63 jedinke. DNA je izolirana iz uzoraka pera i krvi. Metodom PCR umnoženi su dijelovi CHD-W i CHD-Z gena pomoću dva različita para DNA početnica (P2/P8 i 2550F/2718R). Za svaku je vrstu uspoređivano koji je od dva korištena para početnica prikladniji za ovaj način molekularnog određivanja spola te su uspoređivani rezultati dobiveni s DNA izoliranom iz pera i iz krvi. Određen je spol svih analiziranih jedinki: u 3 vrste ptica spol je uspješno određen samo s parom početnica 2550F/2718 dok je u 6 preostalih vrsta spol uspješno određen samo s početnicama P2/P8. Također, pero se pokazalo kao zadovoljavajući izvor DNA što je naročito bitno za istraživanje rijetkih i ugroženih vrsta jer je jednostavnija i manje invazivna metode od uzimanja uzoraka krvi. Istraživanja ptica na molekularnoj razini sve su prisutnija u svijetu, dok su u nas još u začecima, pa ovaj rad smatramo korisnim za daljnja ornitološka istraživanja.

**Ključne riječi:** ptice, molekularno određivanje spola, CHD-Z i CHD-W gen, PCR

**Petra Dolenc, Tanja Šinko:**

## Bird molecular sexing based on CHD-W and CHD-Z gene differences

### **Summary**

Identifying the sex of bird species is important for the understanding of numerous aspects of bird behaviour and ecology and for captive breeding of endangered taxa. However, in many cases sex is difficult or impossible to assess on the basis of phenotype, especially in eggs and nestlings which rarely show sex-linked morphology. Molecular methods of sex determination have proven to be extremely useful in such cases. Method used in this research is based on highly conserved CHD genes that are located on the avian Z and W sex chromosomes. The CHD-W gene is located on the W chromosome and is unique to females. The CHD-Z gene is found on the Z chromosome and therefore occurs in both sexes (female – ZW, male – ZZ). The test is based on the detection of size difference between CHD-W and CHD-Z introns. Using specific primers flanking the intron, PCR amplification and agarose gel electrophoresis, females are characterised by displaying two fragments (CHD-Z and CHD-W), while males show only one fragment (CHD-Z). We analysed nine avian species from four different avian orders (Pelecaniformes, Falconiformes, Psittaciformes and Passeriformes), 63 birds in total. Two different sets of primers (P2/P8 and 2550F/2718R) were used for each species. We also compared the utility and reliability of feather samples to the more traditional blood samples as sources of DNA for PCR. Feathers proved to be an equally reliable source of DNA for molecular sexing of birds. All analysed species were sexed successfully: three species with the primer set 2550R/2718R, and the remaining six species with the P2/P8 primer set.

**Key words:** birds, molecular sexing, CHD-Z and CHD-W gene, PCR

## Životopis

Petra Dolenc

Rođena sam 20. ožujka 1984. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i gimnaziju polazila sam u Oroslavju. Tijekom osnovnoškolskog i srednješkolskog obrazovanja zanimala su me razna područja pa sam tako nekoliko puta sudjelovala na državnom natjecanju Lidrano (literarno, novinarsko i dramsko-scensko stvaralaštvo). Velikim uspjehom smatram osvojeno drugo mjesto na državnom natjecanju pokreta "Znanost mladima" održanom u Kaštel Lukšiću. Iz tog šireg interesa postupno sam se usmjerila prema prirodoslovlju te upisala studij biologije (smjer ekologija) na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kao apsolvent upisala sam razliku kolegija za profesorski smjer. U suautorstvu objavila sam dva članka u časopisima s međunarodnom recenzijom. Posebno me zanimaju zakonitosti ekologije kao i biologija temeljena na molekularnim metodama. Stoga mi je izrada ovog rada bila veliko zadovoljstvo.

Tanja Šinko

Rođena sam 14. studenog 1983. godine u Čakovcu. Po završetku osnovnoškolskog obrazovanja nastavila sam školovanje u Gimnaziji Čakovec. Sudjelovala sam na raznim natjecanjima, a najveći uspjeh mi je bilo osvojeno drugo mjesto na državnom natjecanju iz engleskog jezika u Ogulinu i prvo mjesto na Reviji animiranog filma s animiranim uratkom "Opsesija" koji je i na međunarodnim smotrama postigao značajne rezultate. Biologija i uopće priroda počele su me zanimati od rane mladosti iz čega je proizašao studij biologije (smjer ekologija) na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Posebno me zanimaju područja u biologiji koja se temelje na međugranskom povezivanju pa mi je izrada ovog rada bila posebno zadovoljstvo.