

ANALIZA CHD GENA U CILJU DETERMINACIJE POLA KOD ZAŠTIĆENIH VRSTA PTICA

Vučičević, M.,³⁴ Stevanović, J.,¹ Simeunović, P.,¹ Vučićević, I.,¹ Đelić, N.,¹ Stanimirović, Z.¹ Stojić V.¹

Sažetak: Uzimajući u obzir da je preko 50% vrsta ptica monomorfno, determinacija pola bazirana na fenotipskim karakteristikama je kod tih vrsta skoro nemoguća. Determinacija pola kod ptica je veoma značajan deo programa zaštite i konzervacije ugroženih vrsta koje su pod zaštitom države. Primena molekularnih metoda omogućava pouzdanu, brzu i ekonomičnu determinaciju pola kod većine vrsta ptica. Cilj rada bio je determinacija pola kod pojedinih vrsta ptica nastanjenih u Srbiji koje se nalaze pod zaštitom države. DNK je izolovana iz perja tako da uzorkovanje nije narušavalo fizički i psihički integritet jedinke. Amplifikacija visoko konzervisanog CHD gena je obavljena korišćenjem 2550F/2718R seta prajmera. Determinacija je bila uspešna kod svih analiziranih uzoraka poreklom od 10 vrsta ptica. Ova jednostavna procedura može biti značajna za programe očuvanja genetičkih resursa.

Cljučne reči: CHD gen; zaštićene vrste ptica; determinacija pola;

Uvod

Lovstvo je grana privrede sa potencijalno velikim značajem za Srbiju. U našoj zemlji postoji 321 lovište sa ukupnom površinom od oko 9 miliona ari [1]. U Srbiji se 25 vrsta ptica uzgaja u lovištima. Pod zaštitom Zakona o zaštiti prirode [2] u našoj zemlji se nalazi 21 vrsta pernate lovne divljači.

Populacije ptica mogu biti ograničene različitim faktorima, kao što su zalihe hrane, raspoloživa teritorija, gnezdilišta, predatori i paraziti. Postoje dva naročito značajna momenta u životnom ciklusu ptica kad jedan ili više faktora mogu ograničiti gustinu populacije: klimatski uslovi i reproduktivni periodi [3]. Odgovarajući odnos mužjaka i ženki je naročito značajno znati tokom perioda razmnožavanja. Reprodukcijska je moguća držanjem mužjaka i ženki zajedno u odgovarajućem prostoru.

Odnedavno je postalo očigledno da je determinacija pola postala esencijalan deo *ex situ* programa konzervacije ugroženih vrsta ptica, uključujući i one koje se love. Informacije o polu se deo ukupnih podataka potrebnih za istraživanja ekologije, oblika ponašanja, genetike i konzervacione biologije [4].

Više od 50% vrsta ptica je monomorfno [5], što čini determinaciju pola na osnovu njihovih fenotipskih karakteristika nemogućom. Jedna od najvećih poteškoća proizilazi iz odsustva spoljašnjih reproduktivnih organa. Osim toga, veoma je teško odrediti pol i kada su u pitanju mladunci dimorfnih vrsta [6]. Kod zaštićenih vrsta ptica postoji potreba za determinacijom pola i kod odraslih jedinki monomorfnih vrsta i kod mladunaca dimorfnih vrsta ptica.

Tradicionalne metode determinacije pola ptica su bazirane na posmatranju i proučavanju polno specifičnih oblika ponašanja i na poređenju različitih morfoloških entiteta kao što su težina i dužina repa, veličina i boje perja, dužina glave i kljuna [7] [8] [9] [10]. Kloakoskopija je bila široko primenjen metod [11], ali je zahtevala dobro obučeno osoblje. Međutim, čak i stručnjaci mogu napraviti grešku pri određivanju pola monomorfnih vrsta. Osim toga, ne uzimajući u obzir patke i labudove, kod većine ostalih vrsta ptica kloaka je morfološki identična kod mužjaka i ženki.

Hiruške metode (laparoskopija i laparotomija), koje omogućavaju direktno posmatranje gonada, iako uspešne u većini slučajeva, agresivne su [12], pa čak letalne za ptice [13]. Ultrazvuk se takođe može koristiti za determinaciju pola kod mnogih vrsta ptica [14], ali dobijanje rezultata primenom ove metode može biti dosta komplikovano usled prisustva vazdušnih kesa [15].

Determinacija pola primenom citogenetike se bazira na razlici u morfologiji polnih hromozoma. Kod ptica, za razliku od sisara, ženke su heterogametne – imaju 2 različita polna hromozoma (ZW), dok su mužjaci homogametni (ZZ). Međutim, postoje brojne prepreke koje prate ovaj metod determinacije pola poput toga da ćelije krvi sadrže velik broj hromozoma – od 40 do 126, u zavisnosti od vrste [16]. Nedavno, jednostavnije, jeftinije i efikasnije tehnike su razvijene, tako da se citogenetska determinacija pola izuzetno retko koristi [17].

Tehnike bazirane na DNK su mnogo pouzdanije u odnosu na druge tehnike. Najveći broj DNK metoda za osnovu ima reakciju lančane polimeraze (PCR). U prvim decenijama korišćenja, DNK istraživanja su bila naporna, skupa, nebezbedna i spora. Ipak, sa razvojem novih metoda, DNK analize su postale jednostavnije, jeftinije, brže i bezbedne. Razvijanje PCR metode dovelo je do istinske revolucije u genetičkim istraživanjima. Sigurno je da je PCR metoda postala najznačajnije sredstvo za molekularne biologe [18]. Takođe, uzorci mogu biti količinski izuzetno mali, poput jednog pera ili malih količina fecesa, a cela determinacija može biti završena za oko 4 sata ,

³⁴ Miloš Vučićević, asistent, Jevrosima Stevanović, dr, docent, Predrag Simeunović, asistent, Ivana Vučićević, asistent, Ninoslav Đelić, dr, redovni profesor, Zoran Stanimirović, dr, redovni profesor, Velibor Stojić, dr, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Autor za kontakt: Miloš Vučićević, Fakultet veterinarske medicine, Bulevar oslobođenja 18, 11000 Beograd, Srbija; E-mail: milosvucicevic@vet.bg.ac.rs; Tel. +38162222012

bez uticaja na pouzdanost testa. Izolacija genomske DNK iz perja pomaže smanjivanju stresa koji prati uzorkovanje, eliminiše nepotrebna krvarenja i umanjuje mogućnost razvijanja infekcije i to bez ugrožavanja tačnosti i pouzdanosti rezultata.

Ispitivanje hromozoma je tokom vremena usavršeno sa citogenetskog na molekularni nivo. Najpouzdaniji rezultati determinacije pola se dobijaju analizom polimorfizma polno specifičnog CHD gena. Zahvaljujući razlici u veličini CHD W i CHD Z gena i korišćenjem CHD specifičnih prajmera, PCR amplifikacijom se produkuju dve trake kod uzoraka poreklom od ženskih jedinki i jedna traka kod uzoraka poreklom od mužjaka.

Cilj rada bio je ispitati mogućnost primene jednog univerzalnog neinvazivnog metoda za determinaciju pola ugroženih vrsta ptica, naročito onih vrsta zaštićenih Zakonom o zaštiti prirode Republike Srbije [19].

Material i metod rada

Uzorkovanje i izolacija DNK

U ovom radu pol je determinisan kod 30 jedinki poreklom od 10 vrsta ptica: *Podiceps cristatus*, *Platalea leucorodia*, *Ciconia ciconia*, *Anser fabalis*, *Cygnus olor*, *Haliaetus albicilla*, *Falco subbuteo*, *Aquila heliaca*, *Buteo buteo* i *Corvus frugilegus*. Sve navedene vrste se nalaze pod zaštitom Zakona Republike Srbije. Po jedno grudno pero je isčupano od svake jedinke.

DNK je izolovana i perja korišćenjem KAPA Express Extract seta za izolaciju (KAPA Biosystems, cat No KK7103). Odsecana je baza pera veličine 2-5 mm i nakon toga izolacija DNK je vršena po preporukama proizvođača seta za izolaciju DNK. Inkubacioni korak protokola na 75°C je produžen na 20 minuta. 50 µL dobijenog izolata je dodato u 200 µL TE pufera. Deset µL tako dobijenog razređenog izolata je korišćeno u PCR reakciji.

PCR amplifikacija

Za amplifikaciju CHD gena korišćen je sledeći set prajmera: 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') i 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') [20].

25 µL PCR reakciona smeša za amplifikaciju CHD gena sadržala je 12,5 µL KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (2X), 1,25 µL svakog prajmera (2550F i 2718R) i 10 µL izolovane DNK.

Korišćen je preporučeni termalni protokol za KAPA2G Robust HotStart ReadyMix: početna denaturacija na 95°C tokom 3 minuta, 45 ciklusa sastavljenih od denaturacije na 95°C tokom 15 sekundi, hibridizacije na 52°C tokom 15 sekundi i DNK ekstenzije na 72°C tokom 15 sekundi nakon čega je sledila finalna ekstenzija DNK na 72°C tokom 8 minuta.

Vizuelizacija PCR produkata

PCR produkti su vizuelizovani korišćenjem UV svetla nakon bojenja 2% agaroznog gela u etidijum bromidu. U cilju određivanja položaja amplifikovanih traka korišćen je komercijalni marker O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder (Fermentas).

Rezultati istraživanja i diskusija

Korišćeni protokol se pokazao efikasnim kod svih ispitivanih uzoraka (Slika 1.). Pol je uspešno određen kod svih ispitivanih jedinki (N=30) poreklom od 10 vrsta iz sledećih redova: Podicipediformes, Ciconiiformes, Anseriformes, Falconiformes i Passeriformes. Do sada nisu postojali objavljeni rezultati za 2 vrste (*Anser fabalis* i *Buteo buteo*). Za vrste roda *Platalea* i takođe kod vrsta familija Accipiteridae i Anatidae dosadašnja ispitivanja nisu davala jasne rezultate [21] [22]. Sve vrste ispitivane u ovom radu su značajne za očuvanje biodiverziteta geografskog područja na kom su nastanjene i zaštićene su Zakonom. Pod uslovima navedenim u poglavlju Materijal i Metode, set prajmera 2550F/2718R amplifikovao je trake koje se razdvajaju na 2% agaroznom gelu. Kod uzoraka poreklom od ženskih jedinki mogli smo da vizuelizujemo 2 amplifikovane trake veličine oko 400 i 650 bp (CHD-W i CHD-Z), dok se kod mužjaka vizuelizovala samo jedna traka veličine oko 650 bp (CHD-Z), što je u saglasnosti sa prethodno publikovanim podacima za srodne vrste ptica [23].

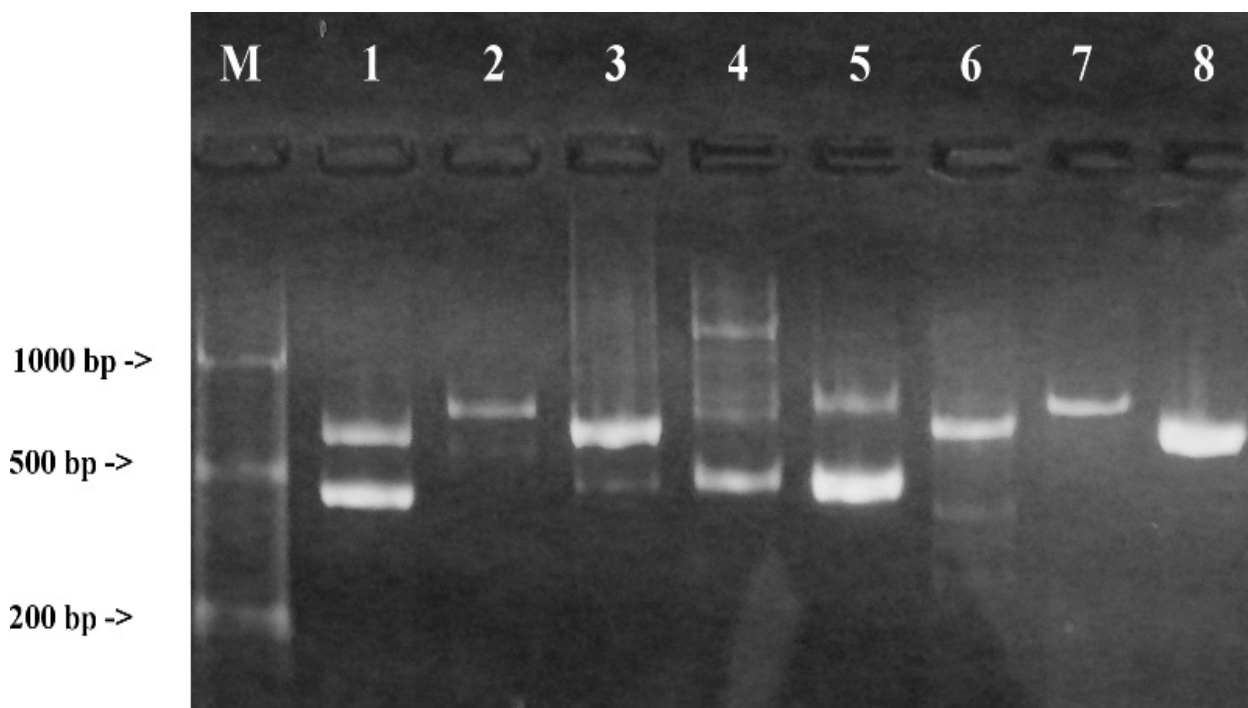
Dizajn prajmera 2550F/2718R je takav da je W – fragment manji te je moguća determinacija pola čak i kada se samo jedan fragment vizuelizuje i to usled razlike u veličini traka [24]. Kod naših uzoraka to je bio slučaj kod uzoraka poreklom od vrste *Falco subbuteo* i to je prethodno opisano kod Accipitridae, Anatidae, Falconidae, Gruidae i Scolopacidae [25].

Sa intenzivnim razvojem industrije i smanjenjem ekološke savesti ljudskog društva, sve je veći broj vrsta ptica koje izumiru ili su na ivici izumiranja. Postoje brojni programi zaštite ptica sa ciljem očuvanja različitih vrsta ptica kroz intenzivno gajenje. Ti programi svakako podrazumevaju i tačno određen pol jedinki.

Pojedine vrste ptica naseljavaju čitavu severnu hemisferu i status ugroženosti tih jedinki na globalnom nivou nije kritičan [26]. Međutim, na regionalnom, nacionalnom i lokalnom nivou, mnoge populacije pernate lovne divljači su u opadanju i ugrožene su. Najznačajniji faktori koji utiču na veličinu populacije lovnih vrsta ptica su seča šuma, uznemiravanje ptica na gnezdištima, upotreba hemikalija u poljoprivredi i šumarstvu, krivolov, šumski požari, degradacija staništa, predatorske vrste, zagađivanje životne sredine i klimatske promene [27].

Postoji nekoliko inicijativa za očuvanje biodiverziteta Evrope i Balkanskog poluostrva koje uključuju i Srbiju. Neki od najznačajnijih ciljeva programa jesu očuvanje i reintrodukcija populacija mnogih ugroženih vrsta ptica ovog područja [28] [29].

Iako zakonodavstvo u Srbiji obuhvata zaštićene vrste ptica, ne postoji klasifikacija statusa i što je mnogo bitnije, kazne za ubijanje zaštićenih vrsta su daleko od standarda evropskih zemalja. To potvrđuje da je potrebno još mnogo stvari uraditi u cilju izbegavanja daljeg opadanja populacija divljih vrsta ptica. Zaista, zaštita pernate lovne divljači u



Slika 1. Prikaz dobijenih rezultata determinacije pola različitih vrsta ptica na agaroznom gelu obojenom u etidijum bromidu

M – Ladder, 1 – *Corvus frugilegus* (♀), 2 – *Buteo buteo* (♂), 3 – *Aquila heliaca* (♀), 4 – *Falco subbuteo* (♀), 5 – *Haliaeetus albicilla* (♀), 6 – *Cygnus olor* (♂), 7 – *Anser fabalis* (♂), 8 – *Ciconia ciconia* (♂), M – Ladder

Srbiji je od velikog značaja za očuvanje divljih vrsta na mnogo širem području nego što je to Srbija koja predstavlja jedan od 6 centara biodiverziteta Evrope [30] [31].

Zaključak

Da zaključimo, metod za determinaciju pola prikazan u ovom radu je pouzdan, ekonomičan, brz, jednostavan i ne zahteva agresivno uzorkovanje biološkog materijala za izolaciju DNK, što je naročito bitno kada se radi sa zaštićenim vrstama ptica. Rezultati koji su predstavljeni mogu imati značaj za brojne programe zaštite i reintrodukcije zaštićenih vrsta ptica, što bi omogućilo očuvanje i obogaćivanje biodiverziteta Republike Srbije. Usled visoke konzervisanosti CHD gena, ovaj metod pruža mogućnost korišćenja kod većine vrste ptica [32], uključujući zaštićene i ugrožene, što će biti predmet daljih istraživanja.

Zahvalnost

Istraživanje je finansirano od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, projekat br. III 46002, pod rukovođenjem prof. dr Zorana Stanimirovića.

Eksperiment je u saglasnosti sa trenutno važećim zakonima Republike Srbije, gde je eksperiment u celosti i obavljen.

Literatura

- [1] Rankovic, N., Kecic, Lj., Radosavljevic, A. Šumarstvo, 56, 1-2: 35-48, 2004. [2] Zakon o zaštiti prirode, "Službeni glasnik RS", br. 36/2009, 88/2010 i 91/2010. [3] Cote, I., Sunderland, W. Conservation Biology, 11, 2: 395-405, 1997. [4] Lee, M., Hong, Y., Park, S., Kim, Y., Choi, T., Lee, H., Min, M. Genes and Genomics, 30: 365-372, 2008. [5] Griffiths, R., Double, M., Orr, K., Dawson, R. Molecular Ecology, 7: 1071-1075, 1998. [6] Kahn, N., John, J., Quinn, T. Auk, 115: 1074-1078, 1998. [7] Tella, J., Torre, I. Journal of Ornithology, 134: 187-190, 1993. [8] Baker, A.J., Piersma, T. Condor, 101: 887-893, 1999. [9] Jodice, P.G.R., Lanctot, R.B., Gill, V.A., Roby, D.D., Hatch, S.A. Waterbirds, 23: 405-15, 2000. [10] Mendenhall, C., Sekercioglu, C., Brenes, F. Journal of Field Ornithology, 81: 49-63, 2010. [11] Hochbaum, H.A. Trans. N. Amer. Wildl. Conf., 7: 299-307, 1942. [12] Griffiths, R., Phil, D. Semin. Avian. Exot. Pet., 9: 14-26, 2000. [13] Swengel, S.R. National Biological Service/International Crane Foundation: United States of America, 223-231, 1996. [14] Hildebrandt, Y., Pitra, C., Sommer, P., Pinkowski, M. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 26: 367-376, 1995. [15] Jensen, T., Durrant, B. Zoo Biology, 25: 25-34, 2006. [16] Griffiths, R., Phil, D. Semin. Avian. Exot. Pet., 9: 14-26, 2000. [17] Archawaranon, M. Biotechnology, 3: 160-164,

2004. [18] Sørensen, K.B. Applied Microbiology And Molecular Biology In Oilfield Systems, 2: 27-31, 2011. [19] Zakon o zaštiti prirode, "Službeni glasnik RS", br. 36/2009, 88/2010 i 91/2010. [20] Fridolfsson, A., Ellegren, H. Journal of Avian Biology, 30: 116-121, 1999. [21] Wang, L., Chen, C., Lee, H., Li, S., Lir, J., Chin, S, Pu, C., Wang, C. Zoo Biology, 26: 425-431, 2007. [22] Ong, A., Vellayan, S. Zoo Biology, 27: 62-69, 2008. [23] Ong, A., Vellayan, S. Zoo Biology, 27: 62-69, 2008. [24] Dawson, D., Darby, S., Hunter, F., Krupa, A., Jones, I., Burke T Molecular Ecology Notes, 1: 201-204, 2001. [25] Fridolfsson, A., Ellegren, H. Journal of Avian Biology, 30: 116-121, 1999. [26] Storch, I. Wildlife Biology, 13: 5-12, 2007. [27] Gačić, D., Puzović, S., Zubić, G. Šumarstvo, 61, 1-2: 155-167, 2009. [28] Skoric, S., Stefanovic, K., Marinkovic, S. Archives of Biological Sciences, 59: 5-6, 2007. [29] Tucakov, M. Acrocephalus, 25: 71-78, 2004. [30] Stanimirovic, Z., Vucinic, M., Stevanovic, J. Savremena poljoprivreda, 48, 1-2: 17-23, 1999. [31] Radovic, I. Biodiversity Strategy of Serbia for the period 2011 – 2018, Ministry of Environment, Mining and Spatial Planning, 18-33, 2011. [32] Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N., Stanimirovic, Z. Zoo Biology, DOI: 10.1002/zoo.21010, 2012.