

DETERMINACIJA POLA PTICA U FUNKCIJI MENADŽMENTA PERNATE LOVNE DIVLJAČI

Vučičević, M.,¹ Stevanović, J.,¹ Vučićević, I.,¹ Pantelić, A.,² Đelić, N.,¹ Resanović, R.,¹ Stanimirović Z.¹

Sažetak: Determinacija pola ptica je značajna za ostvarivanje dobrog menadžmenta pernate lovne divljači. Uzimajući u obzir činjenicu da su mladunci svih vrsta ptica monomorfni, determinacija pola na osnovu fenotipskih karakteristika kod njih je skoro nemoguća. Pravovremeno formiranje parova i jata je osnov dobrog menadžmenta i iz tog razloga je neophodno poznavati pol ptica u lovištu. Cilj rada bio je razvijanje pogodnog metoda za brzu determinaciju pola baziranog na molekularnim markerima (CHDZ, CHDW), a koji se može primenjivati kod pernate lovne divljači. DNK je izolovana iz perja, a amplifikacija CHD gena je obavljena korišćenjem 2550F/2718R seta PCR prajmera. Pol je određen kod svih testiranih uzoraka poreklom od 7 vrsta pernate lovne divljači. Metod razvijen u ovom radu može se koristiti za uspostavljanje održivog menadžmenta pernate lovne divljači i za efikasnu determinaciju pola lovnih vrsta ptica.

Cljučne reči: CHD gen; pernata lovna divljač; determinacija pola; odnos polova

Uvod

Determinacija pola zasnovana na fenotipskim karakteristikama je kod ptica izuzetno teška, ako ne i nemoguća, kako kod odraslih jedinki monomorfnih vrsta, tako i kod mladunaca dimorfnih vrsta ptica. Odgovarajuće znanje o starosnoj i polnoj strukturi ekonomskog godišnjeg izlova je esencijelno za pravilan menadžment populacijama divljači. Ornitolozi su generalno saglasni da postoje varijacije između odnosa polova kod divljih vrsta ptica [1]. Postoji odnos između odnosa polova i demografije, ponašanja i opstanka populacija. Oblici ponašanja poput poligamije, multiple kopulacije, zaštite partnera i zajednički uzgoj su često povezani sa odnosima polova i zaista, možda su se razvili kao njihova posledica [2]. Uzrok ovakvih variranja od očekivanog odnosa polova 1:1, koji se može naći kod većine vrste sisara, još uvek nije objašnjen [3] [4]. Odstupanja u odnosu polova imaju uticaj na ekologiju, monitoring i konzervaciju [5].

U odgajivačkim centrima se obavlja uzgoj i trgovina velikog broja ptica i za njih je determinacija pola od izuzetnog značaja. Kod nekih vrsta ptica neophodno je imati tačno određen broj jedinki i specifičan odnos polova unutar istog prostora za držanje. To je potrebno u cilju održavanja fizioloških oblika ponašanja i preveniranja pojave poremećenih i patoloških oblika ponašanja koji često mogu voditi ka smrti ptice. Kada se jedinke jednog pola nađu u višku, one nisu sposobne da se bore za teritoriju. Te jedinke ostaju same i nazivaju se „plutajućim“ individuumama [6] [7]. To su najčešće mlade i neiskusne životinje [8]. Nedvosmislena determinacija pola je neophodna za uspostavljanje legislative u cilju zaštite svih ugroženih vrsta ptica.

Nedvosmislena determinacija pola mladunaca je od značaja kod mnogih vrsta ptica. Kriterijumi na osnovu kojih se vrši određivanje pola mogu biti od izuzetne važnosti kod vrsta kod kojih su mužjaci i ženke različite veličine zato što neuočeno odstupanje u odnosu polova u uzorku može izmeniti rezultate istraživanja rasta, preživljavanja, hranidbenog ponašanja i ostalih aspekata biologije vrste.

Kod pojedinih vrsta ptica, određen broj mužjaka i ženki se pušta u lovišta i uspešna reprodukcija može biti postignuta samo pri specifičnom odnosu polova. Među monogamnim vrstama značajne su: poljska jarebica (*Perdix perdix*), jarebica kamenjarka (*Alectoris graeca*), prepelica (*Coturnix coturnix*), leštarka (*Tetrastes bonasia*), šumska šljuka (*Scolopax rusticola*), grlica (*Streptopelia turtur*), gugutka (*S. decacoto*) divlja guska (*Anser anser*), žutokljuni labud (*Cygnus cygnus*) i jastreb kokošar (*Accipiter gentilis*). Od poligamnih vrsta najznačajnije su fazan (*Phasianus colchicus*), veliki tetreb (*Tetrao urogallus*) i velika droplja (*Otis tarda*). Formiranje parova i jata je poželjno uraditi što je pre moguće, dakle neophodno je determinisati pol odmah nakon izleganja. Podjednako je bitno ne povrediti jedinku tokom uzorkovanja tkiva. Sem toga, u pojedinim zemljama, tokom sezone lova, dozvoljeno je loviti isključivo mužjake ili isključivo ženke određenih vrsta.

Uzimajući sve navedeno u obzir, cilj ovog rada bio je razvijanje pogodne metode za brzu determinaciju pola na osnovu molekularnih markera, koja bi se mogla primenjivati kod pernate lovne divljači. Pri determinaciji pola primenom molekularnih metoda, najčešće korišćeni uzorci jesu krv, perje, bris usne duplje ili feces. Uzorkovanje krvi podrazumeva grubu manipulaciju jedinkama i sveukupno je vrlo stresno za pticu i nosi sa sobom visok nivo rizika. Uzorkovanje perja i feseca je najpoželjnije jer ne zahteva fizički kontakt sa jedinkom i ne narušava fizički i

¹ Miloš Vučićević, asistent, Jevrosima Stevanović, dr, docent, Ivana Vučićević, asistent, Ninoslav Đelić, dr, redovni profesor, Radmila Resanović, dr, redovni profesor, Zoran Stanimirović, dr, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

² Aleksandar Pantelić, Lovački savez Srbije

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

psihički integritet životinje. Pri određivanju pola mladunaca, krhkih jedinki ili ugroženih vrsta, od izuzetne je važnosti svesti stres prouzrokovan manipulacijom ptice na najmanju moguću meru [10]. U ovom radu za potrebe determinacije pola koristili smo perje jer je njegovo uzorkovanje neinvazivno po pticu.

Materijal i metod rada

Uzorkovanje i ekstrakcija DNK

Test determinacije pola obuhvatio je 35 jedinki iz 7 vrsta ptica: divlja guska (*Anser anser*), guska glogovnjača (*A. tabalis*), gaćac (*Corvus frugilegus*), prepelica (*Coturnix coturnix*), poljska jarebica (*Perdix perdix*), šumska šljuka (*Scolopax rusticola*) i fazan (*Phasianus colchicus*). Kod svake vrste, pol je determinisan kod 5 jedinki. Jedno grudno pero je uzorkovano od svake ptice i stavljeno u obeležen koverat.

DNK je izolovana i pera 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. Inkubacioni korak protokola na 75°C je produžen na 20 minuta. 50 µL dobijenog izolataje 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'-GTTACTGATTCGCTACGAGA-3') i 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') [11].

PCR reakciona smeša, zapremine 25 µL, 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

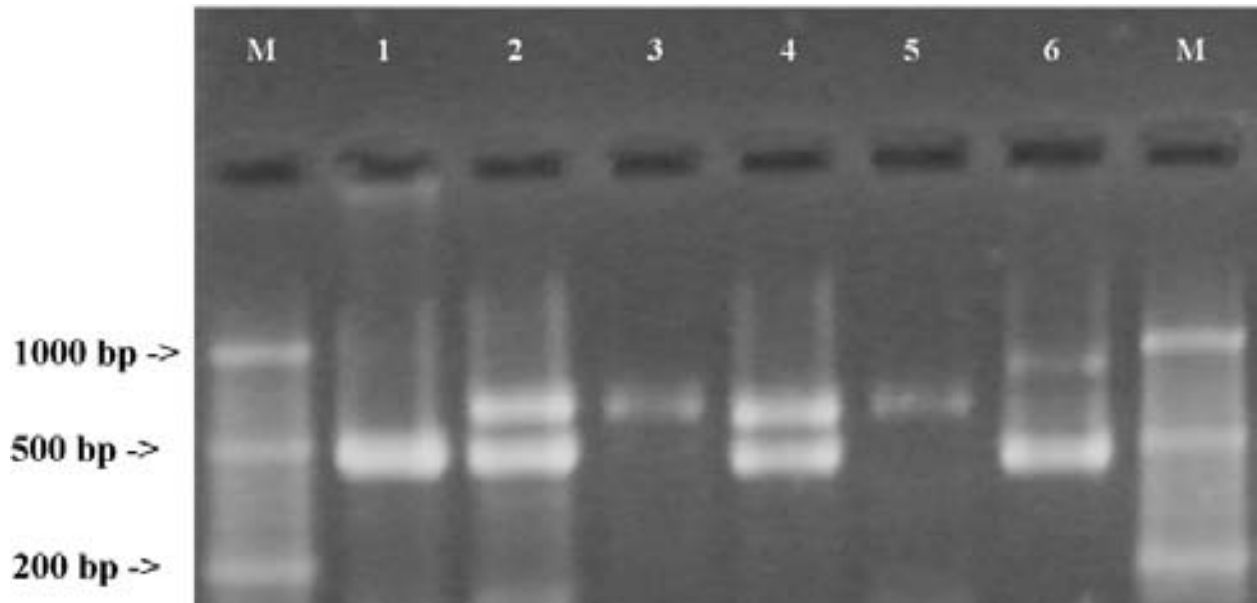
Razvijeni metod se pokazao uspešnim kod svih uzorkovanih jedinki (N=35) poreklom od 7 vrsta ptica (Slika 1). Količina DNK izolovana iz samo 1 pera bila je dovoljna za amplifikaciju polno specifičnog CHD gena i za determinaciju pola. Pod uslovima opisanim u poglavlju Materijal i Metode, set prajmera 2550F/2718R je amplifikovano razdvojene trake na 2% agaroznom gelu. Sveukupno seksiranje kod svih vrsta ptica obavljeno je korišćenjem 2550F/2718R seta prajmera. Kod muških jedinki se konstantno vizuelizovala samo jedna amplifikovana traka (CHD-Z) veličine oko 650 bp, dok su se kod ženki vizuelizovale 2 trake veličine 400 i 650 bp (CHD-Z and CHD-W).

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 [12]. Kod naših uzoraka to je bio slučaj kod uzoraka poreklom od vrsta *Anser anser* i *Phasianus colchicus*, a ta pojava je opisana kod Accipitridae, Anatidae, Falconidae, Gruidae, and Scolopacidae [13].

Prve metode determinacije pola ptica bile su bazirane na posmatranju i proučavanju reproduktivnih oblika ponašanja i to roditeljskog ponašanja kao najpouzdanijeg. Nešto pouzdanije metode su se bazirale na poređenju različitih morfoloških entiteta kao što su težina ili dužina repa [14], veličina i koloracija perja [15], reproduktivni oblici ponašanja, dužina glave i kljuna [16].

Teškoće određivanja pola ptica proističu iz odsustva spoljašnjih reproduktivnih organa. Kloakoskopija je bila često korišćen metod [17], ali je zahtevala obučeno osoblje koje će je izvoditi. Međutim, čak su i stručnjaci pravili greške pri određivanju pola monomorfih vrsta. Pored toga, sa izuzetkom pataka i labudova, kod većine vrsta ptica kloaka je morfološki identična kod mužjaka i ženki.

Hirurške metode determinacije pola su laparoskopija i laparotomija. Obe navedene metode omogućuju direktno posmatranje gonada [18]. Laparoskopija zahteva upotrebu anestezije a pticama je neophodno pružiti postoperativno zbrinjavanje nakon intervencije. Laparotomija se izvodi postavljanjem reza na levoj strani abdomena između poslednja 2 rebra. Rez mora biti dovoljno velik da omogući postavljanje metalnog instrumenta u abdominalnu duplju kako bi se razmakli organi gastrointestinalnog trakta i omogućila vizuelizacija gonada. Gonade se nalaze duž kičme, odmah ispod torakalne šupljine. Kod mužjaka se nalaze 2 testisa, dok se kod ženki u najvećem broju slučajeva nalazi samo jedan jajnik. Jasnija vizuelizacija gonada se postiže pri laparoskopiji, korišćenjem fiberoptičkih kablova. Međutim i za ovu proceduru je neophodno napraviti mali rez na abdomenu. Problemi koji prate ove dve metode jesu atrofične gonade kod jedinki koje se ne koriste za reprodukciju i male gonade kod vrsta



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

M – Marker, 1 – *Anser anser* (♀), 2 – *Corvus frugilegus* (♀), 3 – *Perdix perdix* (♂), 4 – *Coturnix coturnix* (♀), 5 – *Scolopax rusticola* (♂), 6 – *Phasianus colchicus* (♀), M – Marker

koje su morfološki male veličine, kao i kod mladunaca svih vrsta. Mana ovih metoda jeste i to što samo ispitivanje može povrediti jedinku pa čak biti i letalno [19].

Citogenetika se može koristiti za determinaciju pola ptica. Mužjaci ptica su homogametni (ZZ), dok su ženke heterogametne (ZW). Ovaj metod se bazira na razlici u morfologiji polnih hromozoma. Tokom evolucije, W hromozom je izgubio većinu svojih gena i shodno tome veličina mu je redukovana. Nasuprot tome, Z hromozom je veoma konzervisan i veći je od W hromozoma. Ipak, postoje brojne poteškoće koje prate ovaj metod poput toga da ćelije krvi ptica ne daju zadovoljavajuće rezultate a i sadrže velik broj hromozoma – od 40 do 126, u zavisnosti od vrste [20]. Takođe, većina hromozoma ptica su mikrohromozomi i teško je izbrojati ih precizno [21]. Iako hvatanje i fiksiranje ptice predstavlja za jedinku izuzetno stresan trenutak, pri kariotipizaciji neophodno je da to 2 puta učinimo. Prvi put prilikom čupanja pera u cilju uzimanja mladih ćelija i drugi put pri uzorkovanju ćelija rastućeg pera. Iz ovih razloga, kariotipizacija nije metoda izbora za determinaciju pola ptica.

Tokom godina, genetska determinacija pola se sa nivoa hromozoma razvila na molekularni nivo. Griffiths i Tiwari [22] su otkrili 1995. godine CHD gen na W hromozomu. Vrlo srodna kopija ovog gena ubrzo je otkrivena i na Z hromozomu od strane Griffiths i Korn [23] 1997. godine. Ova dva gena su korišćena za determinaciju pola kod velikog broja vrsta. Kod sisara, polno specifična sekvenca je Sry gen. Kod ptica, struktura homologa Sry genu ne postoji, iako visoko konzervisani CHD1W/CHD1Z geni [24], EE0.6 [25] i Wpcki geni [26] mogu biti korišćeni za determinaciju pola. Ovi geni predstavljaju odlične markere za determinaciju pola s obzirom da su funkcionalni deo DNK i da su veoma konzervisani. CHD je zasigurno najznačajniji među njima jer se može koristiti kod skoro svih vrsta ptica, sa izuzetkom trkačica [27]. Reakcija lančane polimeraze (PCR) je pouzdan, ekonomičan, brz i ne toliko komplikovan metod za determinaciju pola kod ptica [28].

Metode determinacije pola su se razvijale u 2 različita pravca. Sa jedne strane, bilo je važno je smanjiti nivo stresa tokom uzorkovanja biološkog materijala na što je moguće manju meru. Sa druge strane, podjednako je bilo značajno razviti metod koji je najtačniji i najpouzdaniji. Kod tradicionalnih metoda osnovni problem je subjektivnost (rezultat zavisi od posmatrača). Ostali nedostaci ovih metoda jesu nepouzdanost rezultata, neophodnost narušavanja fizičkog i psihičkog integriteta jedinke tokom uzorkovanja, rizik za pticu ili osobu koja vrši uzorkovanje i determinaciju, dugo trajanje analiza i nemogućnost determinacije kod mladunaca.

Ipak, napredovanje u molekularnoj genetici je omogućilo prevazilaženje ovih problema [29] [30]. Danas, uzorci za analizu mogu biti količinski vrlo mali, poput jednog pera a sama determinacija može biti završena za oko 4 sata, bez uticaja na pouzdanost testa. Izolacija 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. Iz ovih razloga, determinacija pola primenom molekularnih metoda se pokazala kao korisno sredstvo pri očuvanju divljih vrsta ptica kao dodatak proučavanjima oblika ponašanja i programa uzgajanja [31].

Zaključak

Ravnotežni odnos polova unutar malih populacija je značajan u menadžmentu konzervacije ugroženih i lovnih vrsta ptica [32]. Determinacija pola je neophodna u menadžmentu i konzervaciji lovnih vrsta ptica, za studije ekologije, ponašanja životinja, strukture populacije i proučavanja života jedinki.

Tehnike bazirane na analizi DNK su pouzdanije od tradicionalnih. Molekularne tehnike omogućavaju prednosti neinvazivnih načina determinacije pola i ne zahtevaju korišćenje anestezije ili grubu manipulaciju jedinkama. Amplifikacija polno dimorfnih konzervisanih gena je najveća prednost CHD sekvence i CHD gen može služiti kao skoro univerzalni marker za determinaciju pola kod ptica [33]. Metod razvijen u ovom radu olakšava i ubrzava determinaciju kod lovnih vrsta ptica i doprinosi menadžmentu očuvanja pernate lovne divljači.

Zahvalnost

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

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

Literatura

- [1] Donald, P. *Ibis*, 149, 4: 671-692, 2007. [2] Murray, B.G. *Auk*, 108: 942-952, 1991. [3] Sheldon, B.C. *Heredity*, 80: 397-402, 1998. [4] Pen, I. PhD thesis, University of Groningen, The Netherlands, 2000. [5] Donald, P. *Ibis*, 149, 4: 671-692, 2007. [6] Newton, I. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 67: 129-173, 1992. [7] Sutherland, W. J. Oxford University Press, Oxford, 213, 1996. [8] Zack, S., Stutchbury B. J. *Behaviour*, 123: 194-219, 1992. [9] Bortolotti, G.B. *Journal of Field Ornithology*, 55, 4: 467-481, 1984. [10] Jensen T., Pernasetti, F., Durrant, B. *Zoo Biology*, 22: 561-571, 2003. [11] Fridolfsson, A., Ellegren, H. *Journal of Avian Biology*, 30: 116-121, 1999. [12] Dawson, D., Darby, S., Hunter, F., Krupa, A., Jones, I., Burke T. *Molecular Ecology Notes*, 1: 201-204, 2001. [13] Fridolfsson, A., Ellegren, H. *Journal of Avian Biology*, 30: 116-121, 1999. [14] Martin, C.A., Alonso J.C., Alonso J.A., Morales, M.B. *Bird Study*, 47: 147-53, 2000. [15] Baker, A.J., Piersma, T. *Condor*, 101: 887-893, 1999. [16] Jodice, P.G.R., Lanctot, R.B., Gill, V.A., Roby, D.D., Hatch, S.A. *Waterbirds*, 23: 405-15, 2000. [17] Hochbaum, H.A. *Trans. N. Amer. Wildl. Conf.*, 7: 299-307, 1942. [18] Risser, A.C. *Condor*, 73: 376-379, 1971. [19] Swengel, S.R. *Special techniques, C: Sex determination In: Cranes: Their Biology, Husbandry, and Conservation*; Ellis, D.H.; Gee, G.F.; Mirande, C.M. Eds.; National Biological Service/International Crane Foundation: United States of America, 223-231, 1996. [20] Griffiths, R., Phil, D. *Semin. Avian. Exot. Pet.*, 9: 14-26, 2000. [21] Cerit, H., Avanus, K. *World's Poultry Science Journal*, 63, 1: 91-100, 2007. [22] Griffiths, R., Tiwari, B. *Nature*, 375:454, 1995. [23] Griffiths, R., Korn, R.M. *Gene*, 197: 225-229, 1997. [24] Ellegren, H., Sheldon, B. *Trends. Ecol. Evol.*, 12: 255-259, 1997. [25] Itoh, Y., Suzuki, M., Ogawa, A., Munechika, I., Murata, K., Mizuno, S. *Journal of Heredity*, 92: 315-321, 2001. [26] Hori, T., Asakawa, S., Itoh, Y., Shimizu, N., Mizuno, S. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 3645-3660, 2000. [27] Griffiths, R., Daan, S., Dijkstra, C. *Proceedings of the Royal Society London Biological Sciences*, 263: 1251-1256, 1996. [28] Ellegren, H. *Proceedings of the Royal Society London Biological Sciences*, 263: 1635-1641, 1996. [29] Griffiths, R., Double, M., Orr, K., Dawson, R. *Molecular Ecology*, 7: 1071-1075, 1998. [30] Boutette, J., Ramsay, E., Potgieter, L., Kania, S. *The Journal of Avian Medicine and Surgery*, 16: 198-202, 2002. [31] Dawson, D., Darby, S., Hunter, F., Krupa, A., Jones, I., Burke, T. *Molecular Ecology Notes*, 1: 201-204, 2001. [32] Cerit, H., Avanus, K. *World's Poultry Science Journal*, 63, 1: 91-100, 2007. [33] Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N., Stanimirovic, Z. *Zoo Biology*, DOI: 10.1002/zoo.21010, 2012.