

ISTORIJSKI PREGLED METODA DETERMINACIJE POLA PTICA* *HISTORICAL OVERVIEW OF METHODS FOR SEX DETERMINATION IN BIRDS*

Vučičević Miloš, Stevanović Jevrosima, Šekler Milanko, Resanović Radmila,
Stanimirović Zoran**

Determinacija pola ptica je komplikovana, prevashodno jer je preko 50% vrsta monomorfno (nema morfoloških razlika između polova). Pre primene molekularno genetičkih metoda, koristile su se brojne metode čija je glavna karakteristika da su nepouzdana. Zbog značaja analiza, one moraju biti pouzdane, ekonomične, bezbedne i brze. Visokokonzervativni CHD gen je definisan 1995. godine na W hromozomu ptica, dok je na Z hromozomu definisan dve godine kasnije. Razlika u dužini intronskih sekvenci CHD gena Z i W hromozoma, omogućava razlikovanje polova nakon amplifikacije specifičnih fragmenata primenom specifičnih prajmera. Molekularno genetičke metode imaju primat nad svim ostalim metodama jer osim toga što su bezbedne za izvođenje (i po pticu i po čoveka), daju pouzdane rezultate, a mogu se koristiti kod svih vrsta ptica.

Ključne reči: Određivanje pola, Ptice, CHD gen, PCR, Molekularno genetičke metode

Uvod / Introduction

Ideje o postojanju polnog dimorfizma živog sveta, poreklu i određivanju polova stare su više od tri hiljade godina. Određivanje pola kod ptica je znatno teže nego kod sisara (Stevanović i sar., 2009, Stanimirović i sar., 2012) i izuzetno je zahtevno jer je preko 50% vrsta ptica monomorfno. Takođe, kod bimorfnih vrsta mladunci ptica se ne razlikuju po nekoj spolja vidljivoj karakteristici, što određivanje pola na osnovu morfoloških razlika čini neizvodljivim. Mnoge metode su korišćene za određivanje pola ptica, mnoge se i danas koriste, ali sa izuzetkom

* Rad primljen za štampu 21.09.2016.

** Miloš Vučićević, Jevrosima Stevanović, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; Milanko Šekler, Veterinarski specijalistički institut – Kraljevo; Radmila Resanović, Zoran Stanimirović, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

molekularnih metoda sve su nedovoljno pouzdane ili je njihovo izvođenje suviše skupo i komplikovano (Vučićević i sar., 2010). Identifikacija pola ptica mora biti pouzdana, brza, ekonomična i bezbedna po jedinku i osobu koja analize obavlja (Bošnjak i sar., 2013).

Određivanje pola ptica praćenjem njihovog ponašanja / *Avian sex determination by behavior monitoring*

Metode koje su se najpre primenjivale u cilju određivanja pola ptica zasnivale su se na proučavanju različitih oblika ponašanja (pa i čitavog etograma), ali najčešće reproduktivnog, tj. pre svega roditeljskog ponašanja kao najpouzdanijeg. Ovaj metod je delimično primenjiv i to uglavnom tokom sezone parenja i u prisustvu jedinki oba pola (Jodice i sar., 2000). Veliku zabunu pri primeni ove metode može uneti sposobnost ženki mnogih vrsta ptica (u odsustvu mužjaka) da preuzmu obrasce ponašanja karakteristične za mužjake (Elliot, 1978).

Determinacija pola ptica na osnovu morfoloških osobina / *Avian sex determination based on morphologic characteristics*

Razlikovanje polova na osnovu morfoloških karakteristika je i danas najzastupljenija metoda određivanja pola ptica. Metoda je jednostavna i jeftina (Eason i sar., 2001), nešto pouzdanija od proučavanja ponašanja, ali su rezultati uglavnom daleko od pouzdanih. Razlike u fenotipu mogu biti toliko izražene da se mužjaci i ženke smatraju različitim vrstama (npr. *Eclectus roratus*), ali je to slučaj samo kod malog broja vrsta. Kod više od polovine vrsta ptica nije moguće utvrditi pol polno zrelih jedinki na osnovu morfoloških karakteristika (Heinsohn i sar., 2005). U nedostatke metode se ubraja to što je potrebno znati kako izgledaju mužjak i ženka određene vrste i drugo, što je metodu moguće primeniti tek kod polno zrelih jedinki. Za određivanje pola mogu se porediti neke od morfoloških karakteristika: veličina i masa tela (Kesler i sar., 2006), dužina repa (Martin i sar., 2000), oblik, veličina i obojenost perja (Baker i Piersma, 1999), dužina glave i dužina kljuna (Jodice i sar., 2000), debljina osnove kljuna (Lorentsen i Røv, 1994), dužina krila od karpalnog zgloba do najudaljenijeg vrha (Quintana i sar., 2003), dužina ili debljina tarzusa (Reynolds i sar., 2008) ili rastojanje između pubičnih kostiju (Mendenhall i sar., 2010). Ipak, razlike mogu postojati između istih polova usled geografskih varijacija (Archawaranon, 2002), doba godine ili faze reproduktivnog ciklusa (Marks i Leasure, 1992), što metodu dodatno čini teško primenjivom.

Pojedini autori su određivali pol ptica analizom zvukova koje ptice proizvode (Volodin i sar., 2009). Međutim, ova metoda se ne može smatrati pouzdanom i široko primenjivom, jer je bazirana na hipotezi da struktura kljuna i veličina tela imaju bitnu ulogu pri proizvodnji zvukova (Podos, 2001). Kod mužjaka (većine

vrsta) kljun je jači pa se iz tog razloga oglašavaju bez ponavljajućih zvučnih slogova (Eda-Fujiwara i sar., 2004). Takođe, nedostatak metode jeste da je primenjiva samo kod odraslih jedinki koje se glasno oglašavaju (Volodin i sar., 2009).

U komercijalnom živinarstvu za seksiranje pilića koristi se razlika u kloaki mužjaka i ženki, odnosno utvrđuje se prisustvo pseudopenisa. Intenzivno živinarstvo nije u mogućnosti da izdrži ekonomske troškove koji nastaju usled gajenja mužjaka do trenutka kada se mogu razlikovati od ženki na osnovu spoljašnjeg izgleda i njihovo isključivanje iz proizvodnje tek u tom trenutku. Ova jeftina, brza i efikasna metoda se koristi poslednjih 6 decenija i u intenzivnom živinarstvu je nezamenjiva, a može se koristiti i kod labudova (Hochbaum, 1942). Uspešnost analize (koja obično traje 2 – 3 sekunde) zavisi od istreniranosti pregledača i kreće se od 95% kod iskusnih, do 60% kod manje iskusnih i neiskusnih pregledača (Bramwell, 2003). Kod divljih ptica (najčešće iz redova Procellariiformes, Sphenisciformes i Gruiformes) analizira se veličina otvora kloake jer bi kod ženke trebalo da bude veći usled potrebe prolaska jajeta (Boersma i Davies, 1987). Ograničenja su svakako brojna i odnose se na potrebu visokoobučenog osoblja, fazu reproduktivnog ciklusa u kojoj se životinja nalazi, vreme koje je proteklo od nošenja jajeta, potrebu poznavanja kloake mužjaka i nemogućnost primene kod jedinki koje se ne koriste za reprodukciju (Boersma i Davies, 1987).

Određivanje pola ptica analizom fekalnih steroida / *Avian sex determination by analysis of fecal steroids*

Analiziranje nivoa fekalnih steroida je metoda određivanja pola primenjivana još od 1978. godine i bazira se na utvrđivanju odnosa koncentracije estrogena i testosterona u fecesu ptica (Bercovitz i sar., 1978). Uzorak za analizu uvek mora biti svež, a jedinka od koje se uzima uzorak izolovana od drugih. Nedostaci se ogledaju u potrebi za poznavanjem referentnih vrednosti nivoa hormona kod mužjaka i ženki, postojanju sezonskih varijacija u lučenju hormona, kao i značajnim odstupanjima kod polno nezrelih jedinki (Archawaronon, 1998).

Primena ultrazvuka u određivanju pola ptica / *Determination of sex in birds by ultrasound*

Primena ultrazvuka u određivanju pola sisara je vrlo efikasna i pre i postnatalno. Međutim, kod ptica upotrebu ultrazvuka veoma otežava postojanje vazdušnih kesa i perja, kao i mali razmak između sternuma i pubičnih kostiju (McMillan, 1988). Pri primeni transklokalnih sondi neophodno je ispiranje kloake, dok je tehnički verovatno najznačajniji nedostatak ove metode potreba za sondama veoma malih dimenzija.

Hirurške metode određivanja pola ptica / *Determination of sex in birds by surgical methods*

Hirurške metode određivanja pola kod ptica (laparoskopija i laparotomija) su svakako potpuno pouzdane jer omogućavaju direktnu vizuelizaciju gonada. Međutim, rizik od postoperativnih infekcija i neophodnost primene opšte anestezije često ih čine nepogodnim za primenu (Jones i sar., 1984). Ove metode podrazumevaju korišćenje različitih instrumenta poput otoskopa (Ingram, 1980), artoskopa (Greenwood, 1983), mini laparoscopa (Satterfield, 1980) ili fiberoptičkih endoscopa (Jones i sar., 1984). Kod mladunaca, ova metoda je vrlo teško primenjiva zbog veličine jedinki (Garcelon i sar., 1985), kao i kod gojaznih životinja jer masno tkivo onemogućava vizuelizaciju gonada.

Citogenetičke analize pri određivanju pola ptica / *Determination of sex in birds by cytogenetic analysis*

Citogenetičke analize su našle široku primenu pri različitim analizama kod sisara (Solari, 1994). Između ostalog, ispitivanjem polnih hromozoma moguće je utvrditi i pol. Međutim, kod ptica ispitivanje morfologije polnih hromozoma vrlo je teško izvodljivo (Stefos i Arrighi, 1971). Mužjaci ptica su homogametni (ZZ), dok su ženke heterogametne (ZW). Prvi problem sa kojim se ova metoda susreće je neophodnost uzorkovanja krvi, što je kod ptica dosta stresan (posledično i rizičan) momenat (Archawaronon, 2004). Dalje, kod ptica se broj hromozoma u kariotipu kreće od 40 do 126 i nemoguće je napraviti univerzalan metod određivanja pola analizom Z i W hromozoma. Takođe, kod ptica trkačica razlike između Z i W hromozoma gotovo da ne postoje (Malagó i sar., 2002). Navedene činjenice komplikuju postupak dobijanja jasnog kariotipa i smanjuju preciznost metode (Griffiths i Phil, 2000).

Primena protočne citometrije u određivanju pola ptica / *Determination of sex in birds by flow cytometry*

U cilju određivanja pola ptica (pretežno u eksperimentalne svrhe) 1990. godine je razvijena metoda koja primenjuje protočnu citometriju (Nakamura i sar., 1990). Mala, ali merljiva razlika u količini DNK unutar ćelija mužjaka i ženki čini osnovu ove metode (Tiersch i sar., 1991). Nakon liziranja ćelijskih membrana jedro se boji fluorescentnim bojama koje interkaliraju u DNK lance. Laserski zraci potom ekscitiraju molekule boje i emitovana boja posledično biva detektovana, a podaci obrađeni putem računara. Ova metoda je primenu nalazila kod vrsta sa značajnim razlikama u veličini Z i W hromozoma. Međutim, polimorfizmi na nivou polnih hromozoma ili postojanje repetitivnih sekvenci DNK mogu dosta uticati na verodostojnost rezultata te se metoda ne može smatrati pouzdanom (Tiersch i sar., 1991).

Molekularno-genetičke metode za određivanje pola ptica / *Determination of sex in birds by molecular methods*

Sve navedene metode (uključujući još i UV-rezonantnu Ramanovu spektroskopiju) traže dosta vremena za dobijanje rezultata, zahtevne su, skupe i uglavnom su invazivne (Morinha i sar., 2012). Kako bi se ovi nedostaci savladali, početkom poslednje decenije XX veka razvijene su metode određivanja pola ptica analizom molekula DNK, odnosno molekularno genetičke metode bazirane pre svega na polno-specifičnim markerima. Razlike u nukleotidnim sekvencama između W i Z hromozoma ptica letačica omogućile su razvoj nekoliko molekularnih tehnika koje se poslednje dve decenije uspešno koriste za određivanje pola (Fridolfsson i Ellegren, 1999).

Analiza DNK se pokazala kao odličan osnov za razvoj pouzdane, brze i ekonomične metode određivanja pola ptica. Razvoj PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tehnike sredinom osamdesetih godina prošlog veka označio je početak potpuno nove ere u istraživanjima molekula DNK (Alberts i sar., 2002). Savremena literatura navodi molekularno genetička istraživanja kao najpouzdanija za određivanje pola ptica. Prednost molekularno genetičkih metoda za determinaciju pola kod ptica se ogleda i u činjenici da je za izolaciju DNK dovoljan količinski vrlo mali uzorak, poput jednog pera, uzorka fecesa, kapi krvi ili brisa, a i uzorkovanje pojedinih tkiva ne zahteva uvek direktan kontakt sa jedinkom, hvatanje, manipulaciju, fiksiranje, a samim tim i stresiranje životinje. Determinaciju pola analizom DNK moguće je izvršiti i kod embriona, a ne samo kod tek izleženih jedinki.

Prvom DNK tipizacijom otkrivena je repetitivna sekvenca na W hromozomu 1991. godine, a istovremeno je utvrđeno da 70 - 90% W hromozoma kokoške čine upravo repetitivne sekvence (Saitoh i sar., 1991). Potom je 1992. godine za određivanje pola pilećeg embriona primenjen PCR (Petitte i Keglemeyer, 1992) i usledili su razvoj i primena brojnih metoda: SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) (Glavac i Dean, 1993), analiza mikrosatelita (Graves i sar., 1993), upotreba prajmera specifičnih za W hromozom (Clinton, 1994), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Sabo i sar., 1994), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Miyaki i sar., 1997), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Griffiths i Orr, 1999), amplifikacija mikrosatelita (Nesje i Røed, 2000), ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*) (Chen i Sullivan, 2003) i Real-time quantitative PCR (Arya i sar., 2005).

Određivanje pola primenom hibridizacije DNK bazira se na tome da W hromozom poseduje ponavljajuće sekvence koje se mogu detektovati W specifičnim markerima. Ponavljajuće sekvence su sastavljene od mikrosatelita veličine 2-6 baznih parova (bp) koji formiraju skupine dužine do 150 bp i minisatelita veličine 10 - 100 bp koji prave grupacije dugačke i do 20 kb (Brown, 2002). Za detektovanje mikro ili minisatelita neophodno je iseći DNK restrikcionim enzimima, nakon čega se delovi DNK razdvajaju na osnovu veličine elektroforezom na agaroznom gelu.

Sledi Southern blot metod i inkubiranje DNK fragmenata u prisustvu obeleženih DNK sekvenci (proba). Genomska DNK hibridizuje sa probama a hibridizacija se registruje fluorescirajućim ili enzimskim reakcijama. Kao proizvod reakcije dobija se specifični DNK profil koji se upoređuje sa referentnim DNK profilima mužjaka i ženki (Miyaki i sar., 1997).

Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) je metoda bazirana na činjenici da molekuli jednolančane DNK (*Single Stranded DNA*) u nenedaturišućim uslovima zauzimaju određenu sekundarnu konformaciju zavisnu od nukleotidne sekvence (Kasuga i sar., 1995). SSCP podrazumeva amplifikaciju ciljne sekvence uz denaturaciju dvolančanog PCR produkta, nakon čega sledi razdvajanje dobijenih amplifikata elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Tada fragmenti zauzimaju položaj na osnovu primarne konformacije i prelaze određenu razdaljinu. U zavisnosti od konformacije određuje se pol ptice, ali je metoda suviše skupa, zahteva mnoge optimizacije i komplikovana je za izvođenje (Morinha i sar., 2012).

Određivanje pola ptica analizom razlika na nivou homologih DNK sekvenci moguće je primenom RFLP metode (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* tj. polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata) (Parsons i sar., 1997). Tokom RFLP reakcije DNK sekvence se izlažu delovanju različitih restrikcionih endonukleaza, nakon čega sledi elektroforetsko razdvajanje produkata na agaroznom gelu. Iako je metoda dosta jednostavna i brza za izvođenje, nije našla značajniju primenu zbog komplikovanog odabira adekvatnih restrikcionih mesta usled izuzetne varijabilnosti nukleotidnih sekvenci koje se koriste kao markeri (Costantini i sar., 2008).

Određivanje pola primenom RAPD metode (engl. *Random Amplification of Polymorphic DNA*) podrazumeva primenu slučajno odabranog pojedinačnog, oligonukleotidnog prajmera koji umnožava delove genomske DNK (Galvão i Lages-Silva, 2008). Osnovni problem metode predstavlja nespecifičnost reakcije koja nastaje kao posledica niskih temperatura hibridizacije (najčešće 35 do 40 °C), usled čega se smanjuje i ponovljivost rezultata i povećava mogućnost amplifikacije širokog spektra fragmenata genoma (Williams i sar., 1993). I pored toga što je ispitan veliki broj prajmera ukoliko se vizuelizuje traka karakteristična za W vezanu sekvencu (Huang i sar., 2003), nikada sa sigurnošću to ne može i da se tvrdi te mnogi autori dovode u pitanje pouzdanost primene ove metode (Ellsworth i sar., 1993).

Određivanje pola ptica primenom AFLP metode (engl. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) kombinuje istovremenu primenu PCR i digestije DNK restrikcionim enzimima (Vos i sar., 1995). Početak reakcije podrazumeva razgradnju DNK delovanjem dve restrikcione endonukleaze. Potom sledi vezivanje oligonukleotidnih adaptera za kohezivne završetke fragmenata nastalih delovanjem endonukleaza i amplifikacija selektivnim prajmerima, komplementarnim oligonukleotidnim adapterima i specifičnim nukleotidima originalne, početne sekvence. Na kraju, odvija se selektivna amplifikacija istih prajmera (najčešće sa 3' ekstenzijom). Dobijeni produkti se vizuelizuju na

agaroznom gelu, a nalik RAPD metodi, identifikacija polno specifičnih markera je komplikovana usled polimorfizma DNK sekvenci (Griffiths i Orr, 1999).

Kod RAPD i AFLP metoda determinacije pola ptica neophodno je koristiti i pozitivne kontrole jer se baziraju na detekciji sekvenci na W hromozomu, tj. bez primene pozitivne kontrole ne možemo biti sigurni da li je reakcija neuspela ili je uzorak poreklom od mužjaka (Griffiths, 2000). Posledično, mužjaci mogu biti determinisani samo ukoliko nije prisutna traka karakteristična za ženke, a prisutan marker koji označava pozitivnu kontrolu. W-specifične sekvence lokalizovane RAPD i AFLP metodama koristile su se za sintetisanje prajmera za PCR reakcije u cilju pojednostavlivanja procesa određivanja pola (Griffiths i Orr, 1999).

Kod ptica je moguće određivanje pola i analizom mikrosatelita. Oni su prisutni i u kodirajućim i u nekodirajućim delovima genoma (Guichoux i sar., 2011) i pojedini su polno specifični. Osnovni nedostatak određivanja pola ptica analizom mikrosatelita je neophodnost razvijanja markera specifičnih za vrstu, što svakako drastično otežava proces optimizacije postupka, čineći ga vrlo zahtevnim i ograničene primene u svakodnevnoj praksi (Nesje i Røed, 2000).

ARMS metodom (engl. *Amplification-Refractory Mutation System*) se detektuju nukleotidne varijacije selektivnom PCR amplifikacijom alela (Kofradi i Rebrikov, 2006). Pri primeni ove metode neophodno je koristiti jedan prajmer koji je zajednički za oba alela i dva alel-specifična prajmera sa različitim bazama na 3' kraju u skladu sa mutacijama na ciljnim sekvencama. Na taj način, omogućena je selektivna amplifikacija dva različita alela (Gaudet i sar., 2009). Primena ove metode ograničena je varijabilnošću unutar intronskog polimorfizma između alela na Z i W hromozomima jer se zbog toga pol može odrediti samo kod određenog broja vrsta. Metod je jeftin i jednostavan za izvođenje ali se ne može smatrati univerzalno primenjivim (Ito i sar., 2003).

Početni korak pri određivanju pola ptica primenom PCR podrazumeva izolaciju genomske DNK. Izvor DNK mogu biti krv, perje, uzorak fecesa ili bris, odnosno bilo koje tkivo (Bantock i sar., 2008). Primenom specifičnih prajmera umnožavaju se aleli na Z i W hromozomima. Amplifikacijom alela i njihovom vizuelizacijom na agaroznom gelu utvrđuje se postojanje intronskih varijabilnosti (dužine i nukleotidne sekvence) na nivou polno vezanih gena. Metoda je vrlo pouzdana, jednostavna za primenu, visoko ponovljiva i ekonomična i što je najznačajnije ima potencijal primene kod svih vrsta ptica (Silva i sar., 2011, Vucicevic i sar., 2013).

Epigenetski mehanizmi su relativno skoro otkriveni kod ptica. Repetitivni region na Z hromozomu je slabo metilovan i samim tim transkribovan sa jedinog prisutnog Z hromozoma kod ženki, ali izrazito metilovan na oba Z hromozoma kod mužjaka (ZZ), tako da je kod njih sprečena transkripcija tog regiona. Iz tog razloga region je nazvan MHM (*Male Hyper Methylated*) region (Teranishi i sar., 2001). Takođe, ukoliko je navedeni region uključen u determinaciju pola kod ptica, očekivano je da bude visoko konzervativan te da se može koristiti kao marker kod većine vrsta. Glavna prednost ove metode je mogućnost očitavanja rezultata na

agaroznom gelu, dok je glavni nedostatak metode to što se do sada primenjivao samo kod jedinki reda Galliformes.

Definisanje polno specifičnih sekvenci (koje najčešće ne učestvuju u razvoju pola) na Z i W hromozomu i njihova primena u cilju određivanja pola ptica predstavljalo je revoluciju u ovoj oblasti. Sekvence koje su od najvećeg značaja su: *Wpkci* gen (Hori i sar., 2000), EE0.6 gen (Ogawa i sar., 1997), ATP5A1W gen (Fridolfsson i sar., 1998) i Spindling geni (Itoh i sar., 2001). Međutim, brojnim analizama je utvrđeno da CHD gen (engl. Chromo Helicase DNA – binding gene) ima najveći potencijal da se koristi kao univerzalni molekularni marker za određivanje pola ptica. CHD-W gen je prvi put opisan 1995. godine (Griffiths i Tiwari, 1995), dok je CHD-Z otkriven dve godine kasnije (Griffiths i Korn, 1997). Visokokonzervativne kodirajuće sekvence CHD-Z i CHD-W gena su jednake dužine i njihovo razlikovanje je nemoguće na agaroznom gelu (Fridolfsson i Ellegren, 1999). Razlike koje omogućavaju određivanje pola su na nivou introna jer je intronska sekvenca podložna brzim promenama i mutacijama. CHD gen poseduje veći broj introna (Griffiths i Korn, 1997) ali se jedan od njih – uzvodni, za čiju amplifikaciju se koriste prajmeri 2550F/2718R (Fridolfsson i Ellegren, 1999), koristi pri determinaciji pola ptica. Navedeni prajmeri se vezuju za visokokonzervativnu egzonsku sekvencu obe kopije gena i nakon toga se umnožava nekodirajući intron (koji je različite dužine kod CHD-Z i CHD-W).

Još 1996. godine Ellegren je postavio hipotezu o primeni visokokonzervativnog CHD gena kao molekularnog markera za određivanje pola kod svih vrsta ptica. Upravo zbog visoke konzervativnosti, analize navedenog gena su značajne i za proučavanje evolucije polnih hromozoma ptica i mehanizama nasleđivanja i razvoja pola. Nakon postavljenih osnova, nastavljena su istraživanja CHD gena, proučavanja njegove konzervisanosti i evolucije, a sve u cilju pronalaženja protokola za determinaciju pola koji bi bio funkcionalan kod svih vrsta ptica (Vučićević i sar., 2012a; Vučićević i sar., 2012b). Za razliku od svih prethodno navedenih metoda određivanja pola kod ptica, jedino molekularno genetičke metode, bazirane na analizi CHD gena, objedinjuju pouzdanost, ekonomičnost i brzo dobijanje rezultata. Dodatna prednost se ogleda u činjenici da se kao uzorak može koristiti količinski mali uzorak (poput jednog pera, kapi krvi ili brisa usne duplje) pa uzorkovanje ne mora narušavati fizički integritet jedinke kojoj se određuje pol, a ujedno se izbegava i stresiranje ptice i čuva njena dobrobit.

Zaključak / Conclusion

Opisane metode imaju svoje prednosti i nedostatke. Odabir metode zavisi od opremljenosti laboratorije u kojoj se vrše analize, dostupnosti uzoraka tkiva, iskustva i stručnosti osobe koja vrši determinaciju, vrste ptice i različitih nespecifičnih faktora.

Savremena istraživanja su pokazala da se CHD gen može koristiti kao univerzalni molekularni marker za određivanje pola ptica letačica, da se perje može smatrati uzorkom koji je najbolje koristiti za molekularno genetičke analize pola kod živih ptica i da se par prajmera 2550F/2718R kod svih ptica letačica može koristiti za određivanje pola (Stevanov Pavlović i sar., 2013; Vučićević i sar., 2013; Vučićević, 2014). Dalja istraživanja bi svakako trebalo usmeriti ka definisanju protokola koji bi omogućio pouzdano određivanje pola i kod ptica letačica, primenom identičnih molekularnih markera.

Literatura / References

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2002, Manipulating Proteins, DNA, and RNA, in *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 4th Edition, 508-509
2. Archawaranon M., 1998, Hormonal Correlate of Seasonal Reproduction in Captive Thai Hill Mynahs, *Proc 22 Int Ornithol Congr Durban*, 69, 315-316
3. Archawaranon M., 2002, Zoogeography of various Hill Mynah phenotypes in Thailand, *J Biol Sci*, 2, 645-647.
4. Archawaranon M., 2004, Rapid sexing hill mynah *Gracula religiosa* by sex chromosomes, *Biotechnology*, 3, 160-164
5. Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R., 2005, Basic principles of real-time quantitative PCR, *Expert Rev Mol Diagn*, 5, 209-19
6. Baker A.J., Piersma T., 1999, Molecular vs. phenotypic sexing in Red Knots, *Condor*, 101, 887-893
7. Bantock T.M., Prys-Jones R.P., Lee P.L., 2008, New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens, *Mol Ecol Resour*, 8, 519-28
8. Bercovitz A.B., Czekala N.M., Lasley B.L., 1978, A New Method of Sex Determination in Monomorphic Birds, *J Zoo Anim Med*, 9, 4, 114-124
9. Boersma P.D., Davies E.M., 1987, Sexing Monomorphic Birds by Vent Measurements, *Auk*, 104, 4, 779-783
10. Bosnjak J., Stevanov-Pavlovic M., Vucicevic M., Stevanovic J., Simeunovic P., Resanovic R., Stanimirovic Z., 2013, Feasibility of Non-Invasive Molecular Method for Sexing of Parrots, *Pakistan J Zool*, 43, 3, 715-720
11. Bramwell R.K., 2003, Sexing chicks in the backyard flock, *Avian Advice*, 5, 4-5.
12. Brown T.A., 2002, *Genomes*. 2nd ed. Oxford, BIOS Scientific Publishers: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=genomes.TOC&depth=2
13. Chen X., Sullivan P.F., 2003, Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput, *Pharmacogenomics J*, 3, 77-96
14. Clinton M., 1994, A rapid protocol for sexing chick embryos, *Anim Genet*, 25, 361-362
15. Costantini V., Guaricci A.C., Laricchiuta P., Rausa F., Lacalandra G.M., 2008, DNA sexing in Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples, *Anim Reprod Sci*, 106, 162-7
16. Eason D., Millar C., Cree A., Halverson J., Lambert D., 2001, A comparison of five methods for assignment of sex in the takahe (*Aves: Porphyrio mantelli*), *J Zool Lond*, 253, 281-292
17. Eda-Fujiwara H., Yamamoto A., Sugita H., Takahashi Y., Kojima Y., Sakashita R., Ogawa H., Miyamoto T., Kimura T., 2004, Sexual Dimorphism of Acoustic Signals in the Oriental White Stork: Noninvasive Identification of Sex in Birds, *Zool Sci*, 21, 817-821
18. Elliot L.R., 1978, Sex determination of birds, *Iowa State Univ Vet*, 40, 100-103

19. Ellsworth D.L., Rittenhouse K.D., Honeycutt R.L., 1993, Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns, *Biotechniques*, 14, 214–217
20. Fridolfsson A., Ellegren H., 1999, A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds, *J Avian Biol*, 30, 116–121
21. Fridolfsson A.K., Cheng H., Copeland N.G., Jenkins N.A., Liu H.C., Raudsepp T., Woodage T., Chowdhary B., Halverson J., Ellegren H., 1998, Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes, *P Natl Acad Sci Usa*, 95, 8147–8152
22. Galvão L.M.C., Lages-Silva E., 2008, Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) - A useful tool for genomic characterization of different organisms, in: Walker JM, Rapley R, editors, *Molecular biomethods handbook*. Totowa, NJ. Humana Press, 133–147
23. Garcelon D., Martell M., Redik P., Buøen L., 1985, Morphometric, karyotypic, and laparoscopic technique for determining sex in bald eagle, *J Wildl Manage*, 49, 595-599
24. Gaudet M., Fara A.G., Beritognolo I., Sabatti M., 2009, Allele-specific PCR in SNP genotyping, in: Komar AA, editor, *Single nucleotide polymorphisms, methods in molecular biology* 578, New York; Humana Press, 415–424
25. Glavac D., Dean M., 1993, Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations, *Hum Mutat*, 2, 404–414
26. Graves J.A.M., Ortega-Ruano J., Slater P.J.B., 1993, Sex ratio of chicks in the Shag *Phalacrocorax aristotelis* determined by a female-specific band in DNA fingerprinting, *Ibis*, 135, 470-472
27. Greenwood A.G., 1983, Avian sex determination by laparoscopy, *Vet Rec*, 112, 105
28. Griffiths R., 2000, Sex identification using DNA markers, in: *Molecular methods in ecology* (Backer A. J., Ed.), Blackwell Science, London, 295–321
29. Griffiths R., Korn R.M., 1997, A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus do domesticus*, *Gene*, 197, 225–229.
30. Griffiths R., Orr K., 1999, The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers, *Mol Ecol*, 8, 671-674
31. Griffiths R., Phil D., 2000, Sex identification in birds, *Semin Avian Exot Pet*, 9, 14-26
32. Griffiths R., Tiwari B., 1995, Sex of the last wild Spix's macaw, *Nature*, 375, 454
33. Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R.J., 2011, Current trends in microsatellite genotyping, *Mol Ecol Resour*, 11, 591–611
34. Heinsohn R., Legge S, Endler J.A., 2005, Extreme reversed sexual dichromatism in a bird without sex role reversal, *Science*, 309, 617–619
35. Hochbaum H.A., 1942, Sex and age identification of ducks by cloacal examination, *Trans N Amer Wildl Conf*, 7, 299-307
36. Hori T., Asakawa S., Itoh Y., Shimizu N., Mizuno S., 2000, Wpkci encoding an altered form of PKCI is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role in female sex determination, *Mol Biol Cell*, 11, 3645–3660
37. Ingram K.A., 1980, Oscope technique for Sexing Birds, in *Current Veterinary Therapy VII*. (Edit by Kirk RW), W.B. Saunders, Philadelphia, 656-658
38. Ito H., Sudo-Yamaji A., Abe M., Murase T., Tsubota T., 2003, Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes, *Zool Sci*, 20, 339–344
39. Itoh Y., Melamed E., Yang X., Kampf K., Wang S., Yehya N., Van Nas A., Replogle K., Band M.R., Clayton DF, Schadt E.E., Lusi A.J., Arnold A.P., 2007, Dosage compensation is less effective in birds than in mammals, *J Biol*, 6, 2
40. Jodice P.G.R., Lanctot R.B., Gill V.A., Roby D.D., Hatch S.A., 2000, Sexing adult black-legged kittiwakes by DNA, behavior, and morphology, *Waterbirds*, 23, 405–415
41. Jones D.M., Samour J.H., Knight J.A., Finch J.M., 1984, Sex determination of monomorphic birds by fiberoptic endoscopy, *Vet Rec*, 115, 596-598

42. Kasuga T., Cheng J., Mitchelson K.R., 1995, Metastable single-strand DNA conformational polymorphism analysis results in enhanced polymorphism detection, *PCR Methods Appl*, 4, 227-33
43. Kesler D., Lopes I., Haig S., 2006, Sex determination of Pohnpei Micronesian Kingfishers using morphological and molecular genetic techniques, *J Field Ornithol*, 77, 2, 229-232
44. Kofradi I.A., Rebrikov D.V., 2006, Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe, *Russ J Genet*, 2006, 42, 16-26
45. Lorentsen S.H., Røv N., 1994, Sex determination of Antarctic Petrels *Thalassoica antarctica* by discriminant analysis of morphometric characters, *Polar Biol*, 14, 2, 143-145
46. Malagó Jr W., Heitor M.F., Matheucci Jr E., Medaglia A., Henrique-Silva F., 2002, Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers, *BMC Biotechnology*, 2, 19
47. Marks J., Leasure S., 1992, Breeding biology of Tristram's Storm-Petrel on Laysan Island, *Wilson Bull*, 104, 719-731
48. Martin C., Alonso J., Alonso J., Morales M., Pitra C., 2000, An approach to sexing young Great Bustards *Otis tarda* using discriminant analysis and molecular techniques, *Bird Study*, 47, 147-153
49. McMillan M., 1988, Imaging of Avian Urogenital Disorders, *AAV Today*, 2, 2, 74-82
50. Mendenhall C., Sekercioglu C., Brenes F., 2010, Using interpubic distance for sexing Manakins in the field, *J Field Ornithol*, 81, 49-63
51. Miyaki C.Y., Duarte M.B., Caparroz R., Nunes A.V., Wajntal A., 1997, Sex identification of South American Parrots (Psittacidae, Aves) using the human minisatellite probe 33.15, *Auk*, 114, 516-520
52. Morinha F., Cabral J.A., Bastos E., 2012, Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods, *Theriogenology*, 4, 1, 703-714
53. Nakamura D., Tiersch T.R., Douglass M., Chandler R.W., 1990, Rapid identification of sex in birds by flow cytometry, *Cytogenet Cell Genet*, 53, 201-205
54. Nesje M., Røed K.H., 2000, Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers, *Hereditas*, 132, 261-263
55. Ogawa A., Solovei I., Hutchison N., Saitoh Y., Ikeda J., Macgregor H., Mizuno S., 1997, Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds, *Chromosome Res*, 5, 93-101
56. Parsons B.L., Heflich R.H., 1997, Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations, *Mutat Res*, 387, 97-121
57. Petite J.N., Kegelmeyer A.E., 1992, Sex Determination of chick embryos using a W chromosome-specific oligonucleotide probe and PCR, *Proceedings of the XIX World's Poultry Congress Amsterdam*, 531
58. Podos J., 2001, Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin's finches, *Nature*, 409, 185-188
59. Quintana F., Somoza G., Uhart M., Cassará C., Gandini P., Frere E., 2003, Sex determination of adult Rock Shags by molecular sexing and morphometric parameters, *J Field Ornithol*, 74, 4, 370-375
60. Reynolds S.J., Martin G.R., Wallace L.L., Wearn C.P., 2008, Sexing sooty terns on Ascension Island from morphometric measurements, *J Zool*, 274, 1, 2-8
61. Sabo T.J., Kesseli R., Halverson J.L., Nisbet I.C.T., Hatch J.J., 1994, PCR-based method for sexing roseate terns (*Sterna dougallii*), *Auk*, 111, 1023-1027
62. Saitoh Y., Saitoh H., Ohtomo K., Mizuno S., 1991, Occupancy of the majority of DNA in the chicken W-chromosome by bent-repetitive sequences, *Chromosoma*, 101, 32-40

63. Satterfield W.C., 1980, Diagnostic laparoscopy in birds, In Current Veterinary Therapy VII. (Edit by Kirk RW), W.B. Saunders, Philadelphia, 659-661
64. Silva K.V., Lôbo-Hajdu G., Alves M.A., 2011, Sex determination in *Turdus amaurochalinus* (Passeriformes: Muscicapidae): morphometrical analysis supported by CHD gene, *Rev Biol Trop*, 59, 789-794
65. Solari A.J., 1994, Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates, CRC Press, London, 43-73
66. Stanimirović Zoran, Stevanović Jevrosima (2012) Primena molekularno-genetičkih analiza u veterinarskoj medicini. Zbornik predavanja sa XXXIII Seminara za inovacije znanja veterinara, Feb 24, pp 17-33, Beograd, Srbija
67. Stefos K., Arrighi F.E., 1971, Heterochromosome in birds, *Expt Cell Rec*, 68, 228-231
68. Stevanov – Pavlović Marija, Vučićević Miloš, Bošnjak Jasna, Stevanović Jevrosima, Dimitrijević Vladimir, Resanović Radmila, Stanimirović Zoran, Molecular sex determination of 20 bird species protected in the Republic of Serbia, *Acta Veterinaria*, 2013, 63 (1) 45-51
69. Stevanović Jevrosima, Stanimirović Zoran, Radaković Milena, Đelić Ninoslav (2009) Utvrđivanje roditeljstva i pola goveda iz uzoraka biološkog materijala primenom molekularnih markera, Zbornik predavanja sa XXX Seminara za inovacije znanja veterinara, Feb 13, pp 47-53, Beograd, Srbija
70. Teranishi M., Shimada Y., Hori T., Nakabayashi O., Kikuchi T., Macleod T., Pym R., Sheldon B., Solovei I., Macgregor H., Mizuno S., 2001, Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus, *Chromosome Res*, 9, 147-165
71. Tiersch T.R., Mumme R.L., Chandler R.W., Nakamura D., 1991, The Use of Flow Cytometry for Rapid Identification of Sex in Birds, *Auk*, 108, 1, 206-208
72. Volodin I., Kaiser M., Matrosova V., Volodina E., Klenova A., Filatova O., Kholodova M., 2009, The Technique Of Noninvasive Distant Sexing For Four Monomorphic *Dendrocygna Whistling Duck* Species By Their Loud Whistles, *Bioacoustics*, 18, 277-290
73. Vos P., Hogers R., Bleaker M., Reijnders M., Van De Lee T., Hornes M., Fritjers A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res*, 23, 4407-4414
74. Vučićević Miloš, Analiza CHD gena ptica kao molekularnog markera za determinaciju pola, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 2014
75. Vučićević Miloš, Stevanović Jevrosima, Simeunović Predrag, Vučićević Ivana, Đelić Ninoslav, Stanimirović Zoran, Stojić Velibor, Analysis of the CHD gene for sex determination of protected bird species, Proceedings of the International symposium on hunting, □Modern aspects of sustainable management of game population, June 22-24, 2012b, pp. 83-86, Zemun-Belgrade, Serbia
76. Vučićević Miloš, Stevanović Jevrosima, Vučićević Ivana, Pantelić Aleksandar, Đelić Ninoslav, Resanović Radmila, Stanimirović Zoran, Sex determination in game birds management, Proceedings of the International Symposium on Hunting Modern aspects of sustainable management of game population, June 22-24, 2012a, pp. 91-94, Zemun-Belgrade, Serbia
77. Vučićević Miloš, Stevanov-Pavlović Marija, Bošnjak Jasna, Stevanović Jevrosima, Stanimirović Zoran, 2010, Determinacija pola ptica primenom molekularnih markera, Zbornik radova XII Regionalnog savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja Clinica Veterinaria 2010, Jun 18-20, str. 45-47, Subotica, Srbija
78. Vučićević Miloš, Stevanov-Pavlović Marija, Stevanović Jevrosima, Bošnjak Jasna, Gajić Bojan, Aleksić Nevenka, Stanimirović Zoran, Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing, *Zoo Biology*, 2013, 32, 269-276

79. Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1993, Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers, in: Methods in Enzymology (WU R., Ed.), Academic Press, San Diego, 218, 704–740.

ENGLISH

HISTORICAL OVERVIEW OF METHODS FOR SEX DETERMINATION IN BIRDS

Vučičević Miloš, Stevanović Jevrosima, Šekler Milanko, Resanović Radmila, Stanimirović Zoran

Determining the sex in birds is very difficult, primarily because over 50% of species is monomorphic (no morphological differences between the sexes). Before the application of molecular genetic methods, there were used numerous methods all of which were unreliable. Because of the importance of the analyses, they have to be reliable, economical, safe and prompt. Highly conserved CHD gene is defined in 1995. on W chromosome in birds, while on Z chromosome it was defined two years later. The difference in the length of the intronic sequences of CHD gene of Z and W chromosomes enables the distinguishing of the sexes after amplification of specific fragments by the application of specific primers. Molecular genetic methods have the supremacy over all the other methods because, except for being safe (both for birds and people), they provide reliable results, and also can be applied in all bird species.

Key words: sex determination, birds, CHD gene, PCR, molecular genetic methods

РУССКИЙ

ИСТОРИЧЕСКИЙ ОБЗОР МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА ПТИЦ

Вучичевич Милош, Стеванович Евросима, Шеклер Миланко, Ресанович Радмила, Станимирович Зоран

Определение пола птиц преимущественно является затруднительным, так как свыше 50% видов мономорфны (отсутствуют морфологические различия между полами). До начала применения молекулярно-генетических методов использовались многочисленные методы, основной характеристикой которых являлось отсутствие надежности. Значимость результатов анализа требует, чтобы он являлся надежным, экономичным, безопасным и быстрым. Высококонсервативный ген CHD был открыт в 1995 г. на W-хромосоме птиц, а на Z-хромосоме открыт двумя годами позже. Разница в длине последовательностей интронов гена CHD Z- и W-хромосом обеспечивает дифференциацию полов после амплификации специфических фрагментов путем использования специфических праймеров. Молекулярно-генетические методы имеют примат над всеми остальными методами, поскольку кроме своей безопасности при проведении (и для птиц, и для человека), характеризуются надежными результатами, и могут использоваться применительно ко всем видам птиц.

Ключевые слова: определение пола, птицы, ген CHD, PCR, молекулярно-генетические методы

