

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ
Катедра за биологију



Милош ВУЧИЋЕВИЋ

АНАЛИЗА CNД ГЕНА ПТИЦА КАО
МОЛЕКУЛАРНОГ МАРКЕРА ЗА
ДЕТЕРМИНАЦИЈУ ПОЛА

-Докторска дисертација-

Београд, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of Biology



Miloš VUČIĆEVIĆ

ANALYSIS OF THE CHD GENE IN BIRDS
AS A MOLECULAR MARKER FOR SEX
DETERMINATION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Ментор:

Др Јевросима Стевановић, доцент

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Београд

Чланови комисије:

Др Радмила Ресановић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Београд

Др Зоран Станимировић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Београд

Др Тодор Палић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Београд

Др Миланко Шеклер, научни сарадник

Ветеринарски специјалистички институт, Краљево

Датум одбране: _____ 2014.

Београд

АНАЛИЗА CHD ГЕНА ПТИЦА КАО МОЛЕКУЛАРНОГ МАРКЕРА ЗА ДЕТЕРМИНАЦИЈУ ПОЛА

РЕЗИМЕ

Одређивање пола код птица је изузетно тешко, првенствено због чињенице да је преко 50% врста мономорфно. Пре дефинисања молекуларно генетичких метода, за детерминацију пола код птица користиле су се многе традиционалне методе чија је главна карактеристика, а уједно и највећа мана – непоузданост. Резултати који се добијају применом различитих метода морају бити пре свега поуздани, а анализе економичне, брзе и безбедне.

Висококонзервисани CHD ген је откривен 1995. године на W хромозому птица, док је на Z хромозому откривен 1997. године. Постојање разлике у дужини интрона између Z и W хромозома омогућава разликовање полова након PCR реакције.

У раду су као узорци коришћени перје, крв, брис усне дупље, фецес и парафински ткивни исечци различитих ткива. Поређена је успешност реакција у зависности од тога који је узорак коришћен, као и успешност реакција када се користила обична полимераза и полимераза специјално дизајнирана да буде отпорна на инхибиторе PCR реакције. Коришћењем PCR технике и сета прајмера 2550F/2718R испитана је могућност примене CHD гена као молекуларног маркера за одређивање пола код 550 јединки пореклом од 83 врста птица широко дистрибуираних дуж филогенетског

стабла. Пол је успешно одређен код 74 врсте птица. Од тог броја, за 26 врста не постоје литературни подаци о одређивању пола применом молекуларних метода.

Добијени резултати указују да је као узорак за анализе код живих птица најбоље користити перје и да коришћење полимеразе специјално дизајниране да буде отпорна на инхибиторе PCR реакције даје боље резултате. На основу врста птица код којих је пол успешно одређен, може се закључити да се CHD ген може користити као универзални молекуларни маркер.

Кључне речи: CHD ген, Птице, Молекуларно генетичке методе одређивања пола

Научна област: Клиничка патологија и терапија животиња

Ужа научна област: Болести живине

УДК број: 575.113:598.2

ANALYSIS OF THE CHD GENE IN BIRDS AS A MOLECULAR MARKER FOR SEX DETERMINATION

SUMMARY

Sex determination in birds is extremely difficult, primarily due to the fact that more than 50% of bird species are monomorphic. Many traditional methods that have been used before defining molecular genetics methods have their biggest lack as their main characteristic - the unreliability. The results obtained using different methods should be primarily reliable and analysis should be fast, secure and cost-effective.

Highly conserved CHD gene has been discovered in 1995 on the W chromosome, and in 1997 on the Z chromosome. The difference in the intron length between the two chromosomes allows sex determination after the PCR reaction.

Blood, feathers, buccal swabs, faeces and formalin fixed paraffin embedded tissue samples were used for analysis. We compared the success of the reaction depending on which sample was used, also we compared the success of the reactions when used ordinary polymerases and polymerase designed to be resistant to PCR inhibitors. Using PCR and set of primers 2550F/2718R we have examined the possibility of using CHD gene as molecular markers for sex determination of 550 individuals originating from 83 species of birds widely distributed along the phylogenetic tree. Sex was successfully determined in 74 bird species. In 26 of those it was carried out for the first time using molecular markers and PCR.

Obtained results indicate that feathers should be used for analyses. Also use of polymerase designed to be resistant to inhibitors of PCR gives better results. Based on the bird species in which sex is successfully determined, it can be concluded that the CHD gene can be used as an universal molecular marker for the sex determination in birds.

Keywords: CHD gene, Birds, Sex determination using molecular genetic methods

Major Field of Study: Clinical Pathology and Therapy of Animals

Special Field of Study: Poultry Diseases

UDK Number: 575.113:598.2

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	5
2.1. Историјски преглед метода детерминације пола птица.....	5
2.2. Механизми наслеђивања пола код птица.....	21
2.2.1. Полни хромозоми.....	23
2.2.2. Ембрионални развој гонада	26
2.2.3. Молекуларни механизми развоја пола	29
2.3. CHD ген – полиморфизам и значај у детерминацији пола птица	35
2.4. Апликативни аспекти анализе CHD гена и детерминације пола мономорфних, фармски узгајаних, дивљих и угрожених птица у утврђивању ефективне величине популација и њихове биоконзервације	40
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА.....	49
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	50
4.1. Материјал.....	50
4.2. Методе.....	52
4.2.1. Изолација ДНК из различитих типова тквива птица	52
4.2.1.1. Изолација ДНК из перја.....	52
4.2.1.2. Изолација ДНК из крви	55
4.2.1.3. Изолација ДНК из бриса усне дупље	57
4.2.1.4. Изолација ДНК из фецеса	57
4.2.1.5. Изолација ДНК из ткивних формалинских исечака	58

4.2.2.	Амплификација CHD гена.....	59
4.2.2.1.	Амплификација CHD гена применом <i>Taq</i> ДНК полимеразе.....	59
4.2.2.2.	Амплификација CHD гена применом модификоване <i>Taq</i> ДНК полимеразе дизајниране да буде отпорна на инхибиторе PCR.....	61
4.2.3.	Електрофореза и визуелизација PCR продуката	62
5.	РЕЗУЛТАТИ.....	64
5.1.	Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из различитих типова ткива птица.....	65
5.1.1.	Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из перја.....	66
5.1.2.	Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из крви	67
5.1.3.	Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из бриса усне дупље.....	69
5.1.4.	Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из фецеса	70
5.1.5.	Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из ткивних формалинских исечака	71
5.2.	Успешност амплификације CHD гена применом различитих протокола	72
5.2.1.	Успешност амплификације CHD гена применом <i>Taq</i> ДНК полимеразе.....	72

5.2.2.	Успешност амплификације CHD гена применом модификоване <i>Taq</i> ДНК полимеразе (КАРА2G Robust DNA Polymerase) дизајниране да буде отпорна на инхибиторе PCR.....	75
6.	Дискусија.....	77
6.1.	Поређење успешности изолације ДНК из различитих ткива птица.....	78
6.2.	Поређење успешности различитих протокола за амплификацију CHD гена.....	82
6.3.	Процена универзалности CHD гена као молекуларног маркера за детерминацију пола птица.....	83
7.	Закључак.....	95
8.	Попис литературе.....	96
9.	Прилози.....	122

СКРАЋЕНИЦЕ

ДНК - Дезоксирибонуклеинска киселина

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

Real-time qPCR - *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*

CHD - *Chromo Helicase DNA binding*

FT-IR - *Fourier Transform Infrared*

SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ARMS - *Amplification Refractory Mutation System*

MHM - *Male Hyper Methylated*

PITX - *Paired-like Homeodomain Transcription factor 2*

FOXL2 - *Forkhead Box Transcription Factor*

HINTW - *Histidine Triad Nucleotide Binding Protein*

DMRT1 - *Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor, #1*

CASI - *Cell Autonomous Sex Identity*

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*

CITES - *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna
and Flora*

1. УВОД

Размишљања о пореклу и развијању полова и начинима за њихово одређивање углавном су текла паралелно и постојала су много пре ере науке. Нека рана објашњења сврставају се у митове, приче које нису засноване на чињеницама али оличавају поједине популарне идеје о природним појавама, веровања и културу тог времена. Такве идеје се нису ниподаштавале и оне су понекад служиле као основа за развој научних концепата, односно касније за њихово поједностављивање и приближавање. Како су се стицала нова знања о томе на који начин се развија пол, тако су и методе за одређивање пола бивале поузданије. Прва научна сазнања о развићу и одређивању пола добијена су откривањем сперматозоида у XVII веку. Међутим, порекло и функција ових ћелија остали су непознаница све до средине XIX века. У том периоду откривено је и постојање јајне ћелије људи и започета су проучавања процеса фертилизације. Ипак, веровања да кључну улогу у развићу пола имају фактори спољашње средине одржала су се све до прве четвртине XX века, када је представљена идеја о хромозомској детерминацији пола. Откриће хромозома присутних само код једног пола, поједине хромозомске аномалије, као и полно специфичне секвенце омогућиле су напредак у испитивањима механизма развоја пола али са друге стране и развој метода којима се много поузданије, готово непогрешиво може утврдити пол испитиване јединке.

Прве методе одређивања пола, као и жеља посматрача да зна пол јединке стари су вероватно колико и сами полови. Традиционалне методе подразумевају посматрање фенотипских карактеристика, као и проучавање појединих облика понашања и оглашавања. Након њих, развијене су напредније и поузданије технике као што су анализирање нивоа фекалних стероидних хормона, ултразвук и хируршке методе (лапароскопија и лапаротомија). Са открићем полних хромозома почела је примена цитолошких анализа у одређивању пола птица, али праву револуцију у том пољу представљало је увођење анализа молекула ДНК и метода за умножавање ДНК секвенци путем реакције ланчане полимеразе (*Polymerase Chain Reaction* – PCR).

Код птица се пол формира одмах након фертилизације, наслеђивањем полних хромозома, али је наслеђивање пола регулисано и на генетичком нивоу. Концепт полног размножавања је присутан и есенцијалан код већине еукариота, али је код птица још увек поприлична енигма. Полни хромозоми птица воде порекло од пара аутозома анцестралног претка, а разлози због којих су ти аутозоми започели диферентовање у полне хромозоме и механизми помоћу којих се тај процес одвијао још увек су непознати. Мужјаци птица су хомогаметни (ZZ) док су женке хетерогаметне (ZW) и карактеристика Z хромозома јесте да је високо конзервисан, док то није случај са W хромозомом. Ипак, још увек се не зна да ли је за развој мушког пола кључно присуство два Z хромозома, а женског присуство једног W хромозома. На полним хромозомима распоређени су бројни полно специфични гени, али ни њихова улога није у потпуности разјашњена. За сада, код птица није пронађена секвенца гена која има кључну улогу при развоју мушког или женског пола. Код гинандроморфних јединки откривене су ћелије за које се не зна да ли учествују у формирању гонада или неког ткива, а које поседују полне хромозоме потпуно независно од осталих ћелија унутар организма

При изучавању различитих гена на полним хромозомима свих до сада испитиваних птица летачица (Neognathae) откривен је CHD ген (*Chromo-chelicase DNA Binding gene*) на W (Griffiths и Tiwari, 1995) и Z хромозому (Griffiths и Korn, 1997). Испитивања која су уследила показала су да је наведени ген високо конзервисан не само код птица, већ и на нивоу класе сисара и птица (82,9% на нивоу нуклеотида и 95,6% на аминокиселинском нивоу). Кодирајући делови CHDZ и CHDW гена су високо конзервисани, али полиморфизми интронског региона CHD омогућују одређивање пола. Висока конзервисаност CHD гена искоришћена је за постављање хипотеза о универалности CHD гена као молекуларног маркера за одређивање пола птица.

У оквиру класе птица, постоје врсте са израженим морфолошким полним диморфизмом, али њих има мање од врста код којих се уопште не може одредити пол класичним методама опсервације фенотипских карактеристика (мономорфне врсте). Поред тога, код младунаца свих птица не може се одредити пол традиционалним методама. Због тога су анализе ДНК којима се обавља брзо, поуздано и економично одређивање пола птица изузетно корисне. Користе се у различитим пољима истраживања, али првенствено при проучавању односа полова унутар популација и у програмима очувања угрожених врста птица. Пол птица неопходно је знати и при проучавању понашања, процени начина формирања парова, у менаџменту популација дивљих врста птица, анализама стратегија гајења у комерцијалном живинарству, еволуционим проучавањима и у форензици.

Због великог значаја који анализе одређивања пола птица имају у бројним пољима истраживања, неопходно је пронаћи методу која ће бити поуздана, једноставна за примену, економична, брза за извођење и да се при томе јединкама којима се одређује пол не нарушава физички и психички интегритет, нити да се угрожава безбедност особе која врши анализе. Ова истраживања су била усмерена на испитивање

универзалности CHD гена, као молекуларног маркера и могућности дефинисања метода за одређивање пола примењивог код свих птица. Узоркован је материјал од 83 врсте птица, пореклом из 15 редова (укупно 550 јединки) при чему се тежило да те врсте буду што је могуће више филогенетски удаљене. Анализе су рађене из различитих узорака (перје, крв, фецес, брис усне дупље и парафински ткивни исечци различитих ткива) како би се поређењима примењиваних протокола утврдило који је узорак најпогодније користити.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Историјски преглед метода детерминације пола птица

Идеје о постојању два пола, њиховом пореклу и одређивању старе су више од три хиљаде година. Одређивање пола код птица је изузетно тешко с обзиром на чињеницу да је преко 50% врста птица мономорфно и да се младунци птица не разликују по некој споља видљивој карактеристици. Пре увођења ДНК анализа, за детерминацију пола код птица користиле су се многе традиционалне методе чија је главна карактеристика, а уједно и највећа мана, била непоузданост. Идентификација пола птица мора бити поуздана, брза, економична и безбедна по јединку и особу која анализу обавља.

Ране методе детерминације пола птица биле су базиране на посматрању и проучавању различитих облика понашања и то најчешће репродуктивног, тј. пре свега родитељског понашања као најпоузданијег. У ту сврху најчешће су посматрани обрасци понашања попут удварања, положаја при копулацији, начин исхране младунаца и слично. Детерминација пола посматрањем и проучавањем репродуктивног облика понашања примењива је током сезоне парења али углавном када су истовремено присутне јединке оба пола (Jodice и сар., 2000). Такође, отежавајућу околност представља и чињеница да женке многих врста често преузимају и обрасце понашања који су карактеристични за мужјакe (Elliot, 1978).

Поређење различитих морфолошких карактеристика је једна од најједноставнијих и најјефтинијих метода одређивања пола (Eason и сар., 2001). Наведена метода је нешто поузданија од посматрања и проучавања облика понашања. Такође није инвазивна, с обзиром да није потребно вршити узорковање биолошког материјала за анализу. Код појединих врста птица (нпр. *Eclactus roratus*), разлике у фенотипу су до те мере изражене да су мужјаци и женке дуго времена били сматрани различитим врстама (Heinsohn и сар., 2005). Иако није велики број врста птица са лако уочљивим разликама у морфолошким карактеристикама, пол се може одредити на основу постојања неке разлике у фенотипу код око 50% врста. Највеће ограничење ове методе је то што се може користити само код одраслих (полно зрелих) јединки код којих је полни диморфизам изражен, односно код којих се мужјаци и женке јасно разликују по некој споља видљивој карактеристици. Чак и уколико постоје разлике у фенотипу, неопходно је претходно знати како изгледају и мужјаци и женке врста које се посматрају. У циљу одређивања пола могу се поредити следеће морфолошке карактеристике: величина и маса тела (Kesler и сар., 2006), дужина репа (Martin и сар., 2000), облик, величина и обојеност перја (Baker и Piersma, 1999), дужина главе и дужина кљуна (Jodice и сар., 2000; Hallgrimsson и сар., 2006), дебљина основе кљуна (Lorentsen и Røv, 1994), дужина крила од карпалног зглоба до најудаљенијег врха (Jodice и сар., 2000; Mizuta и сар., 2003; Quintana и сар., 2003), дужина или дебљина тарзуса (Baldwin и сар., 1931; Garcelon и сар., 1985; Reynolds и сар., 2008) или растојање између пубичних костију (Mendenhall и сар., 2010). Прилично нејасни резултати одређивања пола на основу морфолошких карактеристика могу бити последица географских варијација односно разликовања по одређеном параметру на различитим територијама (Archawaranon, 2002). Такође, током различитих делова године или током различитих фаза репродуктивног циклуса ови параметри (нарочито телесна маса) могу изузетно варирати (Marks и Leasure, 1992). Поједини

аутори су описали и методе одређивања пола на тај начин што су фотографисали одређене јединке и затим путем фотографија поредили одређене морфолошке параметре (Cheong и сар., 2007). Метод се може сматрати корисним код угрожених и недоступних врста птица. Такође, постоје и програми који користе већи број параметара добијених мерењем појединих делова тела на основу којих одређују пол јединке. Још једна од чињеница која не иде у прилог коришћењу ове методе јесте да је већина птица нарочито осетљива током репродуктивног периода те им не прија узнемиравање и анализирање наведених морфолошких карактеристика (али и облика понашања) може ометати репродукцију, што није пожељно посебно код угрожених врста птица (Peter и сар., 1991). Варијације у боји перја мужјака и женки могу се детектовати и применом сложенијих техника попут спектрометрије (Mays и сар., 2006), али се овај поступак не користи због цене и компликоване процедуре.

Пол се код појединих птица (пре свега патака) може одредити и на основу карактеристика звукова које испуштају (Volodin и сар., 2009). Ипак, ова метода, иако потпуно неинвазивна, не може се сматрати поузданом и широко примењивом, јер је базирана на хипотези да структура кљуна и величина тела имају битну улогу при производњи звукова (Podos, 2001). Код мушких јединки појединих врста кљун је јачи, односно чвршће грађе па се из тог разлога мужјаци оглашавају без понављајућих звучних слогова (Eda-Fujiwara и сар., 2004). Такође се могу примењивати и сложени алгоритми којима се обрађују звучни записи гласања птица. Током бележења таквих записа неопходно је обезбедити да се сем тих звукова други не чују, што додатно компликује метод. Поред тога потребно је имати опремљене и обучене екипе како би се постигао висок проценат успешности и тачности анализа. Још један недостатак метода јесте да је примењив само код одраслих јединки које се гласно оглашавају (Volodin и сар., 2009).

Један од најпримењивијих метода детерминације пола тек излежених пилића у живинарству је анализирање клоаке. Потреба за оваквим начином одређивања пола код једнодневних пилића развила се раних четрдесетих година XX века током тадашње велике економске кризе првенствено у САД. Фармама које су се бавиле одгојем кока носиља било је неисплативо да гаје и мужјаке до тренутка када је могуће распознавање у односу на женке. Одгој мушких јединки је превише оптерећивао производњу те су се суочавали са реалном опасношћу од озбиљних економских губитака. Метод одређивања пола путем клоаке је био коришћен у Јапану, док се у остатку света називао „мистеријом Оријента“. Године 1934. одржана је прва званична јавна демонстрација примене ове методе на једнодневним пилићима, од стране јапанских стручњака, на Универзитету у Ванкуверу (British Columbia) (Lunn, 1948). Од тада се овај метод сматра најшире примењиваним у комерцијалном живинарству. Метод се базира на уочавању псеудопениса. Овај јефтин, брз и ефикасан метод се може користити и код лабудова (Hochbaum, 1942). Успешност анализе зависи од истренираности прегледача и креће се од 95% код искусних, до 60% код мање искусних и неискусних прегледача (Bramwell, 2003). Просечно време потребно за одређивање пола једнодневног пилета код искусног прегледача креће се од две до три секунде. Ипак, код појединих врста патака чести су случајеви погрешног одређивања пола применом ове методе, односно мужјаци се погрешно детерминишу као женке (Volodin и сар., 2009). Постоје и други начини анализирања клоаке, примењиви код дивљих птица (најчешће из редова Procellariiformes, Sphenisciformes и Gruiformes), који су засновани на мерењу отвора клоаке. Код женки се током одређених фаза полног циклуса отвор шири како би јаје могло лакше да напусти генитални тракт и изађе у спољашњу средину (Boersma и Davies, 1987). Највећа ограничења ове методе јесу могућност одређивања пола само током одређених делова сезоне, код јединки које су скоро снеле јаје, неопходност познавања тих величина и код мужјака

(Serventy, 1956), као и немогућност примене код јединки које се не користе за репродукцију (Boersma и Davies, 1987). Поједини аутори упозоравају и на опасност од оштећења гениталија услед грубе манипулације јединкама (Turner, 1953). Код јединки из реда Columbiformes мужјаци у пределу клоаке поседују две коничне папиле, сваку са једне стране клоаке, величине 1-3 mm које представљају завршни део *vasa deferentia*. Женке овог реда не поседују коничне папиле и њихов пол се може идентификовати визуелизацијом овидукта који се истиче врло бледом, беличастом бојом након реза постављеног на левој страни тела (Swanson и Rappole, 1992). Све наведено иде у прилог чињеници да се овај метод не може користити као универзалан метод за одређивање пола код птица.

Детерминација пола на основу нивоа фекалних стероида први пут је описана 1978. године (Bercovitz и сар., 1978). Метод се базира на одређивању односа концентрација естрогена и тестостерона (Е/Т однос) у фецесу птица. Женке имају виши Е/Т однос у поређењу са мужјацима. Ограничења ове методе су та што узорак фецеса мора бити свеж, а јединка од које се узима узорак мора бити држана изоловано у кавезу како не би дошло до грешке при узорковању. Постоје и сезонске варијације у лучењу хормона (Archawaronon, 1998), а релевантни резултати се добијају углавном само код полно зрелих јединки током сезоне парења (Swengel, 1996). Поједине врсте представљају изузетке па је потребно, за врсту која се испитује, претходно знати референтне вредности Е/Т односа (Bercovitz и сар., 1978).

Ултразвучно одређивање пола је представљано као потпуно неинвазиван, поуздан и брз метод за одређивање пола различитих врста животиња. Првенствено је било коришћено код сисара за одређивање пола ембриона (Curran, 1992), а тек касније се почело примењивати и код птица. Применом ултразвука, завршни део јајовода означен као вагина се види као издужена хипоехогена структура, оштро ограничена ехогеним пољима, док се лумен вагине види као танка линеарна ехогена структура.

Битно је познавати управо величину лумена како би се избегло мешање са ректумом који се налази у пределу вагине. Мушки пол се детерминише тако што се уочава недостатак наведених ехогених структура. Коришћење транскутанних сонди у многоме отежава присуство ваздушних кеса и мало растојање између стернума и пубичних костију (McMillan, 1988). С друге стране, примена интраклоакалних сонди омогућава детекцију положаја, величине и ехогености гонада (Hildebrandt, 1995). Недостаци ове методе су неопходност хватања птице, фиксирање, испирање клоаке и евентуално седација код темпераментнијих и агресивнијих индивидуа. За птице различите величине потребне су различите сонде што компликује и покушљује саму процедуру и птицу излаже стресу. Могуће компликације су општећење зида клоаке, пролапсус клоаке или дистензија зида клоаке.

Постоје и хируршке методе детерминације пола, лапароскопија и лапаротомија. Ове методе подразумевају коришћење различитих инструмента попут отоскопа (Ingram, 1980), артоскопа (Greenwood, 1983), мини лапароскопа (Satterfield, 1980) или фиброоптичких ендоскопа (Jones и сар., 1984). Од нарочитог су значаја јер се резултат добија током самог поступка, а директним посматрањем гонада стиче се увид у анатомске карактеристике репродуктивног тракта, а могуће је и дијагностиковати евентуалне патолошке промене и аномалије (Risser, 1971; McDonald, 1996). Највећи недостатак ових метода је неопходност анестезије што је за птицу изузетно стресан и ризичан поступак (Jones и сар., 1984; Prus и Schmutz, 1987). Опасност такође представља и могућност постоперативних инфекција. Када су младунци свих врста у питању, а нарочито женке, ова метода готово да се не може примењивати услед изузетно мале могућности налажења гонада (Garcelon и сар., 1985). Мана ових метода јесте и то што сам поступак може повредити јединку, па чак бити и леталан (Swengel, 1996). Такође, код птица у заточеништву често се налазе веће количине масних наслага које онемогућавају брзу и недвосмилену идентификацију пола.

За детерминацију пола кичмењака и птица користе се цитогенетичке анализе (Solari, 1994). Основу овог метода чини разлика у морфологији полних хромозома (Stefos и Arrighi, 1971). За разлику од сисара код којих су полни хромозоми означени са X и Y, код птица се обележавају са Z и W. Мужјаци птица су хомогаметни (ZZ), док су женке хетерогаметне (ZW). Испитивање морфологије полних хромозома је могуће вршити једино заустављањем митозе током метафазе, када су хромозоми раздвојени и добро видљиви (Delhanty, 1989). Основни проблем који прати ову методу јесте инвазивност, јер је неопходно узети крв. Ипак, могу се узорковати и ћелије из пулпе пера, али је тада неопходно два пута хватати јединку и чекати око две недеље након првог чупања да ново перо почне да расте (Archawaronon, 2004). Метод је захтеван, изискује доста времена (Christidis, 1985) и не може се примењивати код птица тркачица услед врло мале разлике између Z и W хромозома (Malagó и сар., 2002). Осим тога, птице имају велики број хромозома у кариотипу (од 40 до 126, при чему је код већине тај број око 80), а од тог броја највећи део јесу врло мали хромозоми (микрохромозоми), док мањи део чине велики хромозоми (макрохромозоми) (Tegelstrom и Rytman, 1981). Наведене чињенице компликују поступак добијања јасног кариотипа и смањују прецизност методе (Griffiths и Phil, 2000). Неке од отежавајућих околности јесу честа контаминација узорака, хроничне инфекције или антибиотска терапија јединки од којих се узима узорак.

Године 1990. развијен је метод одређивања пола птица применом проточне цитометрије (Nakamura и сар., 1990). Метод је базиран на разлици у садржају ДНК унутар ћелије. Та разлика јесте мала, али је ипак мерљива (Tiersch и сар., 1991). Поступак се састоји у лизирању ћелије применом пуфера, док се једро боји флуоресцентним бојама које интеркалирају у ДНК ланце. Ласерски зраци ексцитирају молекуле боје и емитована боја последично бива детектована, а подаци обрађени путем рачунара. Разлике у садржају ДНК могу се израчунати на основу

добијених вредности, односно различитих нивоа флуоресценције. Овај метод је примену налазио код врста са значајним разликама у величини Z и W хромозома. Полиморфизми на нивоу полних хромозома или постојање репетитивних секвенци ДНК могу доста утицати на веродостојност резултата те се метода не може сматрати поузданом (Tiersch и сар., 1991).

Сваки Z хромозом поседује око 75.000.000 базних парова, док W хромозом има око 260.000 базних парова. Сви остали хромозоми су идентични код мужјака и женки, тако да је укупна количина ДНК унутар једне ћелије код мужјака отприлике за 7% већа него код женки (Stainer и сар., 2010). Ова чињеница је искоришћена за развој неинвазивног метода детерминације пола применом UV-резонантне Раманове спектроскопије. Раманова спектроскопија је спектроскопска техника која се користи за изучавање вибрационих, ротационих и других ниско фреквентних модова система. Базирана је на нееластичном расејавању или Рамановом расејавању, монохроматског светла, обично ласерског у видљивом, блиском инфрацрвеном или блиском ултраљубичастом опсегу. Ласерско светло реагује са молекулским вибрацијама унутар ћелија пулпе пера, што има за последицу померање енергетског нивоа ласерских фотона навише или наниже. Енергетско померање даје информацију о вибрационим модовима система. За анализу је потребно 5-6 пера те се узорковање врши без нарушавања физичког интегритета јединки. Различит садржај ДНК, односно различита величина генома код мушких и женских јединки, даће различит Раманов отисак на основу чега ће бити одређен пол (Harz и сар., 2008). Иако неинвазиван, овај метод захтева употребу осетљиве опреме уз сложено тумачење резултата, такође је скуп и за добијање резултата је потребно пар дана. До сада, метод је примењен само код врсте *Gallus gallus*. Слично овоме, код ћурака је одређиван пол помоћу метода комплементарног Рамановој спектроскопији - FT-IR - *Fourier Transform*

Infrared спектроскопије (Stainer и сар., 2010). Предности и мане овог метода исти су као код претходно описаног.

Сви наведени методи траже доста времена за добијање резултата, захтевни су, скупи и углавном су инвазивни (Morinha и сар., 2012). Како би се ови недостаци савладали, почетком последње деценије XX века доста су унапређени методи одређивања пола птица на основу анализе молекула ДНК, односно молекуларно генетички методи базирани пре свега на полно-специфичним маркерима, због постојања варијација између хомогаметних и хетерогаметних јединки. Разлике у нуклеотидним секвенцама између W и Z хромозома птица летачица омогућиле су развој неколико молекуларних техника које ће се успешно користити за одређивање пола (Fridolfsson и Ellegren, 1999).

Технике базиране на анализирању фрагмената ДНК полних хромозома испољиле су највећи потенцијал за развој поузданог, брзог и економичног метода детерминације пола код птица. Развој PCR технике средином осамдесетих година прошлог века означио је почетак једне потпуно нове ере у истраживањима молекула ДНК (Alberts и сар., 2002). Савремена литература наводи молекуларно генетичка истраживања као најпоузданија за одређивање пола птица. Предност молекуларно генетичких метода за детерминацију пола код птица се огледа и у чињеници да је за изолацију ДНК довољан количински врло мали узорак, попут једног пера, фецеса, капи крви или бриса, а и узорковање појединих ткива не захтева увек директан контакт са јединком, хватање, манипулацију, фиксирање, а самим тим и стресирање животиње. Детерминацију пола анализом ДНК могуће је извршити и код ембриона, а не само код тек излежених јединки.

Године 1991. први пут је извршена ДНК типизација код птица – откривена је репетитивна секвенца на W хромозому, а такође је откривено и да 70 - 90% W хромозома кокошке чине репетитивне секвенце (Saitoh и сар., 1991). Након тога, за рану детерминацију пола пилећих ембриона

примењен је PCR (Petitte и Keglemeyer, 1992). Уследили су развој и примена бројних метода попут SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), заснованог на анализи специфичне секундарне формације зависне од нуклеотидне секвенце (Glavas и Dean, 1993), анализа микросателита (Graves и сар., 1993), употреба прајмера специфичних за W хромозом (Clinton, 1994), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), који се базира на амплификацији специфичних маркера само код једног пола (Sabo и сар., 1994), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Miyaki и сар., 1997), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Griffiths и Orr, 1999), амплификација микросателита (Nesje и Røed, 2000), ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*) (Chen и Sullivan, 2003), Real-time quantitative PCR (Arya и сар., 2005).

Методи одређивања пола птица базирани на хибридизацији ДНК имају основу у чињеници да W хромозом птица садржи значајан број понављајућих секвенци те да се такве секвенце могу пронаћи применом W-специфичних маркера. Такве понављајуће секвенце садрже микросателите и минисателите. Микросателити су величине 2-6 bp и формирају скупине дужине до 150 bp, док су минисателити дужи (10 – 100 bp) и праве групације дугачке и до 20 kb (Brown, 2002). Како би се микро или минисателити детектовали неопходно је исећи ДНК применом рестрикционих ензима који делују на тачно одређена места дефинисана нуклеотидном секвенцом. Добијени делови ДНК се након тога раздвајају на основу величине путем електрофорезе на агарозном гелу. Следи *Southern blott* метод током чега се делови ДНК инкубирају са одређеним пробама – обележеним ДНК секвенцама. Пробе хибридизују са геномском ДНК а хибридизација се детектује флуоресцирајућим или ензимским реакцијама (у зависности од тога чиме су пробе обележене). Као производ реакције добија се специфични ДНК профил који се након тога упоређује са референтним ДНК профилима пореклом од мужјака и женки (Miyaki и сар, 1997).

Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) представља метод заснован на принципу да у неденатуришућим условима молекули једноструке ДНК (*Single Stranded DNA*) заузимају одређену секундарну конформацију одређену нуклеотидном секвенцом (Kasuga и сар., 1995). SSCP подразумева PCR амплификацију циљне секвенце што је праћено денатурацијом (високом температуром или хемикалијама) дволанчаног PCR продукта, након чега се добијени продукти раздвајају електрофорезом на полиакриламидном гелу. Током електрофорезе настали фрагменти заузимају одређени положај на основу примарне конформације и последично прелазе одређену раздаљину. Теоретски, уколико постоје одређене појединачне промене нуклеотида (тачкасте мутације), оне ће утицати на примарну конформацију и раздаљину коју ће молекула прећи током електрофорезе (Kakavas и сар., 2008). Такве варијације могу утицати на број трака на полиакриламидном гелу што омогућује процену генотипа. Овај метод је коришћен за одређивање пола код неколицине врста птица (Cortes и сар., 1999; Ramos и сар., 2009). Међутим, сувише је скуп, захтева многе оптимизације и компликован је за извођење, што у многоме ограничава његову примену (Morinha и сар., 2012).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) је метод заснован на анализирању разлика на нивоу хомологих ДНК секвенци (Parsons и сар., 1997). Поступак подразумева излагање ДНК секвенци деловању рестрикционих ендонуклеаза и електрофоретском разлагању добијених секвенци на агарозном гелу. Метод је једноставан за коришћење, резултати се добијају брзо, али одабир одговарајућих рестрикционих ензима је изузетно компликован поступак услед велике варијабилности нуклеотидних секвенци које се користе као маркери. Последично, то повећава време потребно за извођење анализе, смањује економичност и поузданост реакције, а генерално умањује примењивост поступка (Bermúdez-Humarán и сар., 2002; Jarvi и Farias, 2006; Costantini и сар., 2008).

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) користи у PCR реакцији појединачни, случајно одабрани олигонуклеотидни прајмер (најчешће десетомер) који амплификује делове геномске ДНК (Salem и сар., 2005; Galvão и Lages-Silva, 2008). Ниске температуре хибридизације (најчешће 35 до 40° C), које су типичне за овакве реакције, умањују специфичност реакције а самим тим и поновљивост резултата али истовремено и омогућавају амплификацију широког спектра фрагмената генома (Williams и сар., 1993). Уколико је нека од трака која се визуелизује на гелу карактеристична за женке, она највероватније представља W-везану секвенцу (Griffiths и Tiwari, 1993; Huang и сар., 2003). И поред тога што је тестиран велики број прајмера, секвенце специфичне за женке не морају увек бити пронађене што у многоме ограничава коришћење ове методе (Lessells и Mateman, 1998) па су и многи аутори доводили у питање поузданост овог метода (Black, 1993; Ellsworth и сар., 1993).

Amplification Fragment Length Polymorphism (AFLP) комбинује примену PCR и дигестије ДНК рестрикционим ензимима (Vos и сар., 1995). Као производ сваке појединачне реакције настаје око 100 ДНК фрагмената. Први корак овог метода подразумева дигестију ДНК са две различите рестрикционе ендонуклеазе. Следи фаза повезивања током чега се олигонуклеотидни адаптери каче за кохезивне завршетке фрагмената насталих деловањем ендонуклеаза. Овај корак је неопходан како се добијени крајеви не би поново спојили, а праћен је амплификацијом селективним прајмерима, комплементарним олигонуклеотидним адаптерима и специфичним нуклеотидима оригиналне, почетне секвенце. Последњи корак подразумева селективну амплификацију применом истих прајмера и то најчешће са 3' екстензијом. Добијени производи се могу визуелизовати и на агарозном и на полиакриламидном гелу. Слично RAPD методу, идентификација полно специфичних маркера је тешка услед великог полиморфизма ДНК секвенци (Griffiths и Orr, 1999).

Код претходно наведена два метода одређивања пола неопходна је и примена позитивне контроле с обзиром да се детектује присуство W везаних секвенци, односно неопходно је разлучити да ли је недостатак W траке последица неуспеле реакције или је у питању мушка јединка (Sabo и сар., 1994; Griffiths, 2000). С тога, применом ових метода мушке јединке могу бити детерминисане само уколико је одсутна трака карактеристична за женке, а присутан маркер који означава позитивну контролу. W-специфичне секвенце локализоване RAPD и AFLP методама користиле су се за синтетисање прајмера за PCR реакције у циљу поједностављивања процеса одређивања пола (Griffiths и Orr, 1999).

Микросателити постоје и у кодирајућим и у некодирајућим деловима генома (Fan и Chu, 2007; Kelkar и сар., 2010; Guichoux и сар., 2011). Код птица су откривени микросателити који су полно специфични и испитана је могућност њиховог коришћења за потребе детерминације пола (Jones и Glenn, 1999). Главни недостатак ове технике је неопходност развијања специес специфичних маркера што отежава процес оптимизације поступка, чини га захтевним и ограничава му ширину примене у рутинској пракси (Nesje и Røed, 2000).

Алел-специфични PCR (AS-PCR или *Amplification Refractory Mutation System* - ARMS) представља метод којим се детектују нуклеотидне варијације селективном PCR амплификацијом алела (Kofiadi и Rebrikov, 2006). За ову технику неопходно је коришћење једног прајмера заједничког за оба алела и два алел специфична прајмера са различитим базама на 3' крају у складу са мутацијама на циљним секвенцама. Такав поступак омогућава селективну амплификацију два различита алела (Gaudet и сар., 2009). Примењивост овог метода ограничена је варијабилношћу унутар интронског полиморфизма између Z и W алела јер се због тога пол може одредити само код одређеног броја врста. Метод је јефтин и једноставан за извођење (Ito и сар., 2003).

Реакција ланчане полимеразе (PCR) метод пре свега захтева, као и све молекуларно генетичке методе, изолацију висококовалитетне геномске ДНК. Као извор ДНК најпогодније је користити перје, мада је могуће користити било који тип ткива, односно врсте ћелија, те се често користе и крв, фецес, брисеви или орожали делови коже екстремитета (Idaghdour и сар., 2003; Jensen и сар., 2003; Harvey и сар., 2006; Handel и сар., 2006; Bantock и сар., 2008). Стандардна методологија подразумева умножавање Z и W алела применом специфичних прајмера дизајнираних тако да прикажу постојање интронских варијабилности (дужине и нуклеотидне секвенце) на нивоу полно везаних гена наком примене електрофорезе. Описан метод је једноставан за примену, није тежак за извођене, високо је поновљив и јефтин је, те стога и има најширу примену од свих тренутно постојећих метода (Silva и сар., 2011).

Појам Real-time PCR подразумева молекуларну технику високе осетљивости која омогућава амплификацију и квантификацију специфичних секвенци нуклеинских киселина као и детекцију умножених продуката у току трајања реакције, тј. у реалном времену. У односу на конвенционални, односно „end-point“ PCR који за визуелизацију продуката реакције захтева употребу агарозних гелова, Real-time PCR пренебрегава овај корак захваљујући употреби флуоресцентних једињења која се специфично или неспецифично везују за производ реакције и омогућавају праћење тока реакције у реалном времену. Једна од главних предности Real-time PCR-а, у односу на конвенционални, јесте могућност одређивања броја копија иницијалног анализираних материјала са високом тачношћу и осетљивошћу (квантитативни Real-time PCR – Real-time qPCR). На основу природе анализе коју примењујемо, Real-time PCR можемо посматрати као квалитативну (присуство/одсуство тражене нуклеотидне секвенце) и квантитативну (одређивање броја копија умножене ДНК) дијагностичку методу. Визуелизација продуката у реалном времену захтева коришћење

флуоресцентних молекула који приказују повећање количине ДНК која се амплификује, пропорционалним повећањем флуоресцентног сигнала. Постоје две главне групе флуоресцентних једињења: 1) флуоресцентне боје које се неспецифично везују за ДНК – SYBR Green и 2) специфичне олигонуклеотидне секвенце обележене флуоресцентним бојама (пробе, енг. „probes“). SYBR Green је најчешће коришћена боја која се неспецифично веже за двоструку ДНК. Слободна у раствору она емитује низак ниво флуоресценције, која се драстично повећава приликом неспецифичног везивања за двоструку ДНК која се амплификује захваљујући одговарајућим прајмерима и полимерази. У оквиру друге групе флуоресцентних једињења, најзаступљеније су TaqMan пробе. Пробе представљају специфичне олигонуклеотидне секвенце комплементарне делу тражене ДНК секвенце, које су на свом 5' крају ковалентно везане за флуоресцентну боју која се назива репортер (различите флуоресцентне боје означене као FAM, ROX, HEX, VIC итд.), а на 3' крају флуоресцентном бојом која се назива квенчер (енг. Quencher; означене као TAMRA итд.). Место специфичног везивања пробе за комплементарну секвенцу тражене ДНК, налази се на неколико (око 10) нуклеотида низводно од везивања прајмера. Све док се налази у близини репортера, квенчер упија његову флуоресценцију, што се огледа појавом базалне (ниске) флуоресценције. Након везивања прајмера и пробе, одговарајућа полимераза започиње катализу комплементарног ланца и својом 5'-3' егзонуклеаза активношћу одваја репортер од квенчера када долази до значајног повећања флуоресценције, односно визуелне детекције амплификованог производа. Метод јесте примењив, али су главни недостаци потреба за високо специфичним пробама и висока цена анализа (Chang и сар., 2008; Chuo и сар., 2010; Rosenthal и сар., 2010). На наведеном принципу заснивају се и нешто сложенији методи попут Real-time PCR-а заједно са анализом криве топљења (Chang и сар., 2008;

Brubaker и сар., 2011) и High-resolution melting (HRM) analysis (Morinha и сар., 2011).

Епигенетски механизми су не тако давно откривени код птица. Доказано је да је репетитивни регион на Z хромозому пилета слабо метилован и самим тим транскрибован са јединог присутног Z хромозома код женки, али изразито метилован на оба Z хромозома код ZZ мужјака, тако да је код њих спречена транскрипција тог гена. Из тог разлога регион је назван МНМ (*Male Hyper Methylated*) регион (Teranishi и сар., 2001). Такође, уколико је наведени регион укључен у детерминацију пола код птица, очекивано је да буде високо конзервисан те да се може користити као маркер код већине врста. Главна предност овог метода је могућност читавања резултата на агарозном гелу, док је главни недостатак метода то што се до сада примењивао само код јединки реда Galliformes.

Револуцију у примени молекуларно - генетичких метода при одређивању пола птица представљало је проналажење различитих полно специфичних секвенци на Z и W хромозомима. Најзначајније од тих секвенци су Wpкs1 ген (Brzoska и сар., 1996; Hori и сар., 2000), EE0.6 ген (Ogawa и сар., 1997), ATP5A1W ген (Fridolfsson и сар., 1998) и Spindling гени (Itoh и сар., 2001). Ипак, највећи потенцијал утврђен је код CHD гена. CHD-W ген је откривен 1995. године (Griffiths и Tiwari, 1995), док је CHD-Z откривен нешто касније, 1997. године (Griffiths и Korn, 1997). Кодирајуће секвенце CHD-Z и CHD-W гена су високо конзервисане и једнаке дужине те их је немогуће разликовати на агарозном гелу након електрофорезе (Fridolfsson и Ellegren, 1999). Региони који омогућавају коришћење CHD гена за детерминацију пола јесу његови интрони. Интронска секвенца је подложна брзим променама и мутацијама, на чему се заснива утврђивање разлика унутар CHD гена након његове амплификације и визуелизације на гелу. CHD ген поседује неколико интрона (Griffiths и Korn, 1997) али један од њих - узводни, за чију амплификацију се користе прајмери 2550F/2718R (Fridolfsson и Ellegren, 1999), налази широку примену при

детерминацији пола птица. Прајмери се везују за конзервисану егзонску секвенцу обе копије гена и последично долази до умножавања некодирајућег интрона који је код CHD-Z и CHD-W различите дужине.

Молекуларно генетичке анализе пола сматрају се најпоузданијим начином одређивања пола код птица. Ellegren је 1996. године поставио хипотезу да се CHD ген, захваљујући својој високој конзервисаности, може користити као универзални молекуларни маркер за детерминацију пола птица. Анализе CHD гена су значајне и из угла проучавања еволуције полних хромозома птица и бољег схватања самих механизма наслеђивања и развоја пола код птица. Након постављених основа, настављена су истраживања CHD гена, проучавања његове конзервисаности и еволуције, а све у циљу проналажења протокола за детерминацију пола који би био функционалан код свих врста птица (Vučićević i sar., 2012a; Vučićević i sar., 2012b). За разлику од свих претходно наведених метода одређивања пола код птица, једино молекуларно генетички методи, базирани на анализи CHD гена, обједињују поузданост, економичност и брзо добијање резултата. Такође, за ову методу као узорак је довољно користити количински мали узорак попут једног пера, те само узорковање не мора нарушавати физички интегритет јединке којој се одређује пол чиме се избегава стресирање птице и чува њена добробит.

Описани методи имају своје предности и недостатке. Одабир метода зависи од опремљености лабораторије у којој се врше анализе, доступности узорака ткива, искуства и стручности особе која врши детерминацију, врсте птице и различитих неспецифичних фактора.

2.2. Механизми наслеђивања пола код птица

Птице код којих је заступљен полни диморфизам су веома познате по својим наглашеним полним карактеристикама – китњасто перје мужјака насупрот једноличном перју женки, разликама у величини и маси тела,

као и обрасцима понашања. Читав низ полно специфичних особина које се могу запазити код птица, али и представника других класа животиња, последица је кључног процеса који се дешава током развића – развоја пола. Код птица, као и код многих других животиња, пол се формира врло рано током ембрионалног развића, готово одмах након фертилизације, наслеђивањем полних хромозома (Smith, 2010). Развијање пола резултира развојем јединки са карактеристикама на основу којих ће бити идентификоване као мужјаци или женке. Разлике између полова код појединих врста могу бити веома мале, неприметне и веома уочљиве. Осим разлика на нивоу генома и хромозома, разлике постоје и по спољашњим карактеристикама, понашању и метаболизму (Hake и O'Connor, 2008).

Научници се већ стотинама година баве питањима наслеђивања, развоја и детерминације пола. Идеје о постојању два пола, њиховом пореклу и одређивању, старе су више од три хиљаде година. Библијски подаци о стварању Еве као и филозофска дела Старе Грчке, дали су неочекиване идеје о концепту полова. Аристотел је, на пример, изнео претпоставку да ће пол јединке зависити од температуре мужјака током коитуса. Сличне претпоставке о утицају фактора спољашње средине на формирање пола одржавале су се све до средине XIX века, када су откривене улоге сперматозоида и јајне ћелије. Идеја о хромозомској детерминацији пола зачета је тек у другој половини XX века (Mittwoch, 2005).

Прво значајно откриће у овој области догодило се почетком XX века са проналажењем полних хромозома. Прецизним анализама мужјака и женки инсеката примећено је да се код оба пола налази подједнак број хромозома уз два додатна хромозома која су била неједнако расподељена. Истраживања која су убрзо уследила код осталих врста животиња показала су да су управо те разлике на нивоу хромозома одговорне за развој различитих полова.

2.2.1. Полни хромозоми

Концепт полног размножавања је присутан и есенцијалан код већине еукариота. Међутим, механизми детерминације пола код различитих класа кичмењака се изузетно разликују и једино се код сисара и птица пол може одредити на основу анализе полних хромозома (Bull, 1983). Ипак, јединствен закључак о еволуцији полних хромозома ове две класе животиња још увек не постоји. Компаративна мапирања гена показала су да су полни хромозоми птица и сисара у потпуности нехомологи те да су највероватније еволуирали од различитих парова аутозома (који су поседовали ген за детерминацију пола) који су постојали код заједничког претка кичмењака, а да се раздвајање догодило пре више од 310 милиона година (Fridolfsson и сар., 1998; Nanda и сар., 1999; Nanda и сар., 2000; Graves и Shetty, 2001; Matsubara и сар., 2006; Stiglec и сар., 2007; Marshall и Graves, 2008). Разлози због којих су ти аутозоми започели диференцирање у полне хромозоме и механизми помоћу којих се тај процес одвијао су још увек непознаница, нарочито јер постоје код великог броја класа животиња као стабилни системи (Gilchrist и Haldane, 1947). Иако сам процес еволуције није довољно познат, сигурно је да су полни хромозоми и птица и сисара еволуирали само по једном у свакој клади, обзиром да сви сисари имају XY, а све птице ZW хромозоме (Graves, 2008).

За разлику од птица тркачица, мужјаци и женке птица летачица имају полне хромозоме који се јасно разликују, што указује на то да су механизми који утичу на развој тестиса и јајника управо под контролом хромозома (Clinton и Haines, 2001).

Код птица развиће пола започиње одмах по оплођењу, наслеђивањем полних хромозома. Међутим наслеђивање пола је регулисано и на генетичком нивоу (Smith, 2010). Припадници класе птица имају константан кариотип ($2n \sim 80$) (Oguma, 1938; Yamashina, 1944; Ohno и сар., 1964; Takagi и Sasaki, 1974) сачињен од неколико пари макрохромозома и

већег броја малих, готово неприметних микрохромозома који се при цитолошким анализама не могу разликовати (Griffin и сар., 2007). Све птице имају полне хромозоме и они се убрајају у макрохромозоме, мада постоје разлике између различитих врста (Takagi и Sasaki, 1974). Мужјаци су хомогаметни (ZZ), док су женке хетерогаметне (ZW). Z хромозом чини око 7-10% читавог генома, углавном је једнаке величине и у зависности од врсте представља четврти или пети хромозом по величини (Ohno и сар., 1964; Tone и сар., 1984; Fehhheimer, 1990). За разлику од Z хромозома, W хромозом се разликује код представника различитих фамилија птица. Код већине летачица је веома мали (и често се убраја у микрохромозоме), док је код птица тркачица приближно исте величине као и Z хромозом (Ohno и сар., 1964; Takagi и Sasaki, 1974). Чак 65% ДНК на W хромозому чине репетитивне секвенце (Ogawa и сар., 1997). Још увек је нејасно из ког разлога су полни хромозоми тркачица врло мало диференцирани, мада постоји могућност и да су стечени тек након раздвајања од летачица. Међутим, ова претпоставка делује мало вероватно с обзиром на хомологију која постоји са полним хромозомима других врста птица (Smith, 2010).

С обзиром да су полни хромозоми свих кичмењака кључни за репродукцију, продужење и опстанак врсте, очекивано је да буду и високо конзервисани (Waters и сар., 2007). Међутим, еволуција полних хромозома је текла нешто другачије, те су Y хромозом сисара и W хромозом птица најпроменљивији део генома, с обзиром да су мета деловања специјалних селективних сила. За разлику од њих, X и Z хромозом показују изузетну конзервисаност (Graves, 2008). Код сисара мужјаци су хетерогаметни (XY), док су женке хомогаметне (XX). X хромозом је високо конзервисан и код већине сисарских врста распоред гена је готово идентичан (Raudsepp, 2004). За разлику од X хромозома, Y хромозом је мали, богат понављајућим секвенцама и сиромашан генима. Гени Y хромозома у многоне варирају код различитих врста, а неколико високо конзервисаних секвенци налази

се на *Sry* гену и његова присутност управо представља окидач за развој мушких јединки (Коорман, 2001; Ross и сар., 2008). Податак да XY и ZW хромозоми немају заједничке гене, потврђује хипотезу да полни хромозоми сисара и птица воде порекло од различитих аутозома заједничког претка који није поседовао полне хромозоме и код кога се пол развијао под кључним утицајем фактора спољашње средине (Graves и Shetty, 2000). Иако изгледају потпуно различито, постоје, уистину врло мали, хомологи региони на X и Y хромозому што говори о њиховом заједничком претку (Skaletsky, 2003).

Изузетно висока конзервисаност Z хромозома која је доказана различитим бојењима хромозома и мапирањем генома подржава теорију да полни хромозоми птица воде порекло од заједничког анцестралног претка (Ohno и сар., 1967). Промене у редоследу гена потврда су интрахромозомских промена (инверзија) док су истовремено и доказ одсуства интерхромозомских прегруписавања. Различита истраживања показала су да различит степен хомологије иде у прилог тези да W хромозом представља деградирани и диферентовани Z хромозом.

Филогенетском анализом интронских секвенци 5 гаметологних гена (CHD1, HINT, SPIN, UBAP2, ATP5A1) дошло се до закључка да се еволуција полних хромозома птица одиграла у 2 ступња и да на нивоу Z хромозома није било неких значајнијих прегруписавања гена те да је врло конзервисан међу врстама (Handley и сар., 2004). Иако је еволуција текла потпуно одвојено од еволуције полних хромозома сисара, постоје поједине сличности које се могу наћи између њих, али су оне последица искључиво конвергентних еволутивних сила (Veyrunes и сар., 2008). Компаративна мапирања гена са Z хромозома и хуманог генома говоре о повезаности гена са Z хромозома и гена на петом и деветом хромозому сисара који су укључени у процесе реверзије пола и дисгенезу гонада (Bennet, 1993; Nanda и сар., 2002), а не о сличностима са полним хромозомима.

2.2.2. Ембрионални развој гонада

На хистолошком нивоу, развој пола код свих кичмењака је високо конзервисан (Graves и Pelchel, 2010). Код пилећег ембриона гонаде постају видљиве као задебљање – генитални гребен (Browder и сар., 1991), на вентро медијалној површини месонефроса у развоју, средином трећег дана инкубације (Hamburger и Hamilton, 1951). На овом нивоу парни органи су морфолошки идентични код оба пола те се означавају и као бипотентни иако је пол јединке већ одређен. Недиференциране гонаде су састављене из спољашњег епителног слоја (кортекс) испод ког се налази слој ћелија прожетих мезенхимом (медула) (Romanoff, 1960; McCarrey и Abbott, 1979). Герминативне ћелије (будући сперматозоиди и јајне ћелије) су пореклом изван гонада јер потичу из екстраембрионалног региона који се назива герминативни полумесец (Fuji moto и сар., 1976). Те ћелије мигрирају у ембрион и доминантно насељавају спољашњи кортикални предео. Ћелије су распоређене асиметрично пре диференцијације пола и код мужјака и код женки већи број налазимо у левој гонади (Vallisneri и сар., 1990; Zaccanti и сар., 1990). Током развића настаће или унилатерални јајник или билатерални тестиси. Код генотипских мужјака (ZZ) развој органа гениталног тракта је симетричан, док је код генотипских женки (ZW) асиметричан. Соматске ћелије са левог гонадалног кортекса пролиферишу, акумулирају се у кортексу и улазе у рану фазу мејотичке деобе. Унутрашња медула бива фрагментисана. Десни јајник почиње са растом али највише што може достићи јесте ниво рудиментираног левог јајника. Иако се потпуно развијени органи структурно изузетно разликују, по функцији и на целуларном нивоу тестиси и јајници су доста слични (Romanoff, 1960). На молекуларном нивоу ова асиметрија је врло детаљно објашњена, а цео процес је зависан од функције *PITX2* gena (*Paired-like Homeodomain Transcription factor 2*). Експресија овог гена се преференцијално дешава у левој гонади где стимулише пролиферацију ћелија (Guioli и

Lovell-Badge, 2007; Ishimaru и сар., 2008; Rodriguez-Leon и сар., 2008). Верује се да је регресија десног јајника и осталих гениталних структура неопходна с обзиром на то да женке могу поднети само један јајовод са јајном ћелијом у развоју, те да би два јајника и јајовода била енергетски сувише скупа за летење. Ипак, ова теорија се још увек налази на нивоу претпоставке и за њу не постоје чврсти докази. Неке врсте птица поседују само десни јајник, док поједине поседују и леви и десни јајник који су функционални.

Код мужјака птица се током диференцијације тестиса активира SOX9 ген половином 6. дана инкубације (Kent и сар., 1996). SOX9 је конзервисан ген, део фамилије SOX регулаторних гена (*Sry* ген је први откривени члан). Експресија овог гена је позитивно регулисана током развоја тестиса код амниотних кичмењака (гмизавци, птице, сисари) (Smith и сар., 2005; Shoemaker и сар., 2007). Испитивања на мишевима указала су да SOX9 гени регулишу диференцијацију Сертолијевих ћелија у тестису који се развија (Kobayashi и сар., 2005). Сертолијеве ћелије се прве диференцирају у гонадама мужјака и њихов развој и организација представљају сигнал за почетак диференцирања Лајдиговим ћелијама које синтетишу андрогене. Код сисара, Y везан *Sry* ген активира SOX9, што представља први корак у развоју тестиса (Sekido и Lovell-Badge, 2008). Пошто је *Sry* одсутан код птица, SOX9 мора бити директно или индиректно активиран сигналом са полних хромозома. Код женских ембриона птица SOX9 ген се никада не активира. Уместо тога, шестог дана развоја ембриона долази до активације естроген – синтетишућег ензима, ароматазе, која је специфична за женке. Такође, то је доказ да естроген има значајну улогу при развијању јајника у женским ембрионима (Smith и сар., 2010).

Врло брзо након диференцирања, ембрионалне гонаде започињу са синтезом хормона (Sweeney и сар., 1997). За разлику од сисара код којих хормони утичу на развој акцесорних полних органа и секундарних

полних карактеристика, код птица они учествују у развоју самих гонада (Wartenberg и сар., 1992; Abinawanto и сар., 1996).

Стероидни хормон, естроген, има централну улогу у развијању гонада код ембриона птица (Scheib, 1983; Vaillant и сар., 2001; Hudson и сар., 2005) и неопходан је за развој јајника (Perrin и сар., 1995). Код ембриона, сви ензими неопходни за производњу прекурсора естрогена – тестостерона и андростенедиона, присутни су код оба пола (Nishikimi и сар., 2000). Не постоје докази да андрогени хормони утичу на рано диферентовање пола на нивоу гонада. Ензими који су неопходни да се естрадиол синтетише из андрогена су P450-ароматаза и 17- β -хидроксистериод дехидрогеназа, присутни су само код женки током шестог дана ембриогенезе (Nakabayashi и сар., 1998). Значај естрогена за развој женки потврђује и чињеница да апликација једне дозе инхибитора ензима ароматазе женском ембриону води ка развоју мужјака (Vaillant и сар., 2001). Рецептори за естроген су присутни у епителним ћелијама леве гонаде код оба пола (Nakabayashi и сар., 1998). Код женских ембриона естроген омогућава пролиферацију спољашњег кортикалног слоја ћелија што представља место мејотичке деобе герминативних ћелија. Ових рецептора у десном јајнику ембриона има изузетно мало или их чак и нема. Значај експресије естрогена у левој гонади мушких ембриона је непознат, али уколико се апликује егзогено, води ка кортикалној пролиферацији и феминизацији ембриона. Окидач за P450-ароматазу и 17- β -хидроксистериод дехидрогеназу је непознат, претпоставља се само да је транскрипциони фактор FOXL2 (*Forkhead Box Transcription Factor*) укључен у тај процес (Hudson и сар., 2005).

Насупрот кључној улози естрогена за развој женки, слична улога тестостерона није доказана током ембрионалног развоја мужјака. Међутим, анти-милеров хормон има значаја за морфогенезу тестиса. Анти-милеров хормон синтетишу и ослобађају Сертолијеве ћелије и одговоран је за регресију Милеровог тракта (који код женки формира

јајовод). Такође, овај хормон је присутан и код женских ебриона с обзиром да десни јајовод регресира код већине врста птица, али је код мушких јединки експресија много интензивнија (Oreal и сар., 1998).

2.2.3. Молекуларни механизми развоја пола

Базични механизам развића пола код птица већ деценијама је непознаница. Постоји хипотеза да развој пола зависи од броја Z хромозома, као и хипотеза да по којој пол зависи од присуства W хромозома. Међутим, ове две хипотезе нису међусобно искључиве (Ellegren, 2000; Smith и Sinclair 2004; Ellegren и сар., 2007).

Кључно питање када је пол птица у питању јесте управо улога полних хромозома у развијању пола, с обзиром на то да сами механизми диференцијације пола нису у потпуности разјашњени. Још увек није познато да ли је присуство W хромозома окидач за развијање женки (као што је случај код мужјака сисара, где окидач представља присуство Y хромозома) или је количина Z хромозома окидач за развијање мушких јединки (Ellegren, 2001; Mizuno и сар., 2002; Kuroiwa и сар., 2009). Различита количина Z и W хромозома код мужјака и женки може водити ка значајном дисбалансу у нивоу експресије гена, како међу полним хромозомима, тако и између полних хромозома и аутозома.

Проучавање развоја јединки са XXУ (Клинефелтеров синдром) и XO (Тарнеров синдром) код фенотипски мушке и женске особе помогло је схватању окидачке улоге Y хромозома код мушкараца. И поред интензивних анализа кариотипа птица, аналогне синдроме је изузетно тешко дијагностиковати (Clinton, 1998). Образац полног развића птица био би дефинитивно најпрецизније дефинисан проучавањем ZO јединки (јединке са само једним полним хромозомом). Међутим, такве јединке до сада нису пронађене па се претпоставља да је та појава летална на нивоу ембриона (Graves, 2003). Слично томе, јединке са ZZW хромозомима су

изузетно ретке и до сада није било могуће проучавати их применом молекуларно генетичких техника (Clinton и Haines, 1999). Код природне популације врсте *Acrocephalus arundinaceus* (велики трстењак) описане су интерсексуалне јединке са десним тестисом, левим овотестисом и фенотипским карактеристикама женке. Ове јединке су поседовале два Z и један W хромозом (Thorne и Sheldon, 1993; Sheldon, 1998; Arlt и сар., 2004). Женке су се репродуковале, а мушки потомци пореклом од тих јединки су имали гене пореклом само са једног Z хромозома (Arlt и сар., 2004). Ово свакако доказује да W хромозом носи са собом детерминанте за развој женки и да је доминантан у односу на Z хромозом, услед постојања ткива јајника и поред два Z хромозома (Lin и сар., 1995). Међутим, регресија оваријалног ткива код појединих јединки доказује да W хромозом ипак није доминантан и да може бити „надјачан“ од стране два Z хромозома (Smith и сар., 2007). Анеуплоидија на нивоу полних хромозома птица није увек летална, међутим, цитолошке методе нису нашле одговарајући успешан прилаз дешифровању ове појаве (Ellegren, 2001).

Развој ембриона може се сматрати и као низ узастопних и понекад преклапајућих фаза које су обично повезане са експресијом појединих гена. Код сисара је идентификована већина гена који учествују у развићу пола и најзначајнији су: WT1, SF1, Sry, Sox9, Dax1 и AMH (Clinton и сар., 2001). Код птица, постоје гени везани за полне хромозоме. Њихова евентуална улога у развоју пола још увек није у потпуности разјашњена. Два најзначајнија гена на полним хромозомима птица су HINTW (такође означен као ASW или PCKI-W), који је специфичан за W хромозом и DMRT1, који се налази на Z хромозому.

HINTW (*Histidine Triad Nucleotide Binding Protein*) је ген за који се верује да представља фактор за развој оваријума код птица. Код представника 40 фамилија птица певачица се може пронаћи конзервисан на W хромозому (Hori и сар., 2000; O'Neill и сар., 2000), а истовремено показује и активност при развоју гениталних структура (O'Neill и сар., 2000). Код летачица

постоји и хомологи ген на Z хромозому. Међутим, структурно и функционално посматрано, сличности између тих хомолога су изузетно мале. На Z хромозому углавном постоји само један ген, док их на W хромозому углавном има неколико копија. Код птица тркачица, ови хомологи су готово идентични, а на оба хромозома налазимо мали број копија гена (Hori и сар., 2000). HINTW врши изузетно снажну инхибицију ензимске активности одговарајућег гена на Z хромозому – HINTZ (Parks и сар., 2004). За сада, ипак има сувише мало доказа који потврђују теорију о доминантној улози W хромозома на развој пола птица (Smith, 2010). Распрострањена експресија овог гена и ван урогениталног система побуђује сумњу да структуре које учествују у развоју пола птица могу деловати директно у ткивима, независно од гонада (Smith и сар., 2007).

Алтернатива теорији о доминантном утицају W хромозома на диференцирање пола јесте тзв. дозно-зависни модел, по коме пол зависи од односа броја Z хромозома и аутозома. Z хромозом носи велики број гена и у недостатку механизма компензације дозе, експресија многих Z-везаних гена је на много вишем нивоу код мужјака него код женки (Itoh и сар., 2007; Arnold и сар., 2008) и на нивоу гонада и на нивоу соматских ткива (Ellegren и сар., 2007). Међу Z-везаним генима налази се и DMRT1 ген за који се верује да може бити кључан за развој мушких јединки. DMRT1 (*Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor, #1*) ген кодира синтезу транскрипционог фактора и једини је ген који је укључен у развој пола код свих метазоа и при томе има значајну улогу код развоја мужјака сисара, птица, гмизаваца, водоземаца, инсеката и нематода (Raymond и сар., 1999; Kettlewell и сар., 2000; Nanda и сар., 2000; Shibata и сар., 2002; Stiglec и сар., 2007). За разлику од већине гена на Z хромозому DMRT1 не показује компензацију дозе код мужјака и показује виши степен експресије код мужјака него код женки пре и током гонадогенезе (Raymond и сар., 1999; Smith и сар., 1999; Oreal и сар., 2002) сугеришући значајност количине гена при развоју мушких јединки. Вероватно најзначајнији доказ да је

DMRT1 примарни ген који утиче на развој мужјака је чињеница да код емуа (*Dromaius novaehollandiae*) ген постоји на Z хромозому, а на W хромозому изостаје (Shetty и сар., 2002). Та чињеница је у сагласности са хипотезом да DMRT1 или ген сличан њему игра важну улогу при развићу пола код свих птица, али и да је та улога зависна од тога да ли је присутан један или оба Z хромозома. DMRT1 је 2009. године означен као ген који код птица има кључну улогу при развоју тестиса (Smith и сар., 2009а). Доказано је да DMRT1 поседује конзервисану позитивну регулацију експресије код ембриона мужјака гмизаваца, птица и мишева (Smith и сар., 1999; Shan и сар., 2000). Код пилећег ембриона, експресија DMRT1 гена постоји и код мужјака и код женки, али је код мужјака већа. Овај ген свакако има врло битну улогу за развој гонада код свих кичмењака и неопходан је за правилан развој мужјака (Smith, 2010). Код птица се налази на Z хромозому а поседују га и тркачице (Shetty и сар., 2002). Експресија DMRT1 гена постоји само на нивоу гонада и то и пре и током диференцијације пола. Искључење његове експресије води ка реверзији пола пилећег ембриона. Постоје индикације да DMRT1 учествује у детерминацији пола, али свако инсистирање на томе је изузетно погрешно (Kuroiwa, 2009). Такође, треба водити рачуна да је могуће да механизми компензације постоје, али тек на посттранскрипционом нивоу (Graves, 2003).

Приказани поглед на развој пола код птица (и кичмењака) изједначава диферентовање гонада са развојем пола. Верује се да експресија гена главног регулатора лоцираног на полним хромозомима одређује да ли ће се генитални гребен развити у тестисе или у оваријум, а такође и да је мушки односно женски фенотип одређен деловањем хормона гонада.

Данас је прихваћено да карактеристике ћелије на које не утичу хормони, присутне и у мушким и у женским ћелијама, имају утицај на формирање коначног фенотипа (Blecher и Erickson 2007; Arnold и Chen

2009; Ngun и сар., 2011). То отвара питање о утицају аутономних ћелија на структурне и функционалне разлике између мужјака и женки, а одговор највероватније зависи од врсте до врсте (Clinton и сар., 2012). Код сисара хормони имају најзначајнију улогу при формирању фенотипа негонадалног ткива, док је код птица, а могуће и код још неких кичмењака, при развијању полног диморфизма много већа и значајнија улога аутономних мушких и женских ћелија (CASI - Cell Autonomous Sex Identity) (Clinton и сар., 2012).

Први пут се посумњало у постојање оваквих аутономних структура 1997. године (Arnold, 1997). Истраживања на гинандроморфним јединкама су потврдила да CASI имају значајну улогу при формирању фенотипа соматског ткива (Zhao и сар., 2010). Детерминација пола се сматрала завршеном у тренутку оплођења, односно наслеђивањем пара полних хромозома. Међутим, са новијим истраживањима све се више верује да је то дугачак процес, који вероватно траје читавог живота. Ипак, није сигурно да ли CASI уопште има неку улогу при формирању било ког соматског ткива или гонада уопште (Clinton и сар., 2012).

Zhao и сарадници су 2010. године представили истраживање на гинандроморфним кокошкама које је требало да да одговор на питање о механизмима развоја пола (Zhao и сар., 2010). Јединке су биле латералне химере, једна половина тела је имала карактеристике мужјака, а друга половина женке. Тзв. „мушка страна тела“ се карактерисала израженијом крестом и подбрадњацима, развијенијом грудном мускулатуром и мамузама у пределу екстремитета. Тзв. „женска страна тела“ се карактерисала мање развијеном грудном мускулатуром и неизраженим крестом и подбрадњацима. Код таквих јединки испитиван је садржај полних хромозома на обе стране тела надајући се проналаску анеуплоидије на нивоу полних хромозома. Ипак, ћелије на мушкој страни тела су поседовале углавном ZZ хромозоме, док су ћелије на женској страни тела доминантно садржале ZW хромозоме. Када су у питању

гонаде, тестиси су били присутни уколико је већина ћелија гонада била са ZZ хромозомима, јајници уколико је већина ћелија гонада била са ZW хромозомима, док се овотестис налазио код јединки са отприлике подједнаким бројем ZW и ZZ ћелија. Иако ова сазнања не откривају механизме развоја пола, битна су јер се може закључити да сам процес развоја пола не зависи једино од хормонске регулације, већ да је прилично аутономан на нивоу ћелија гонада (Smith, 2010). Широко прихваћена догма везана за развој вертебрата је та да гени који учествују у развићу пола контролишу диференцијацију ембрионалних гонада у тестисе или оваријуме, који онда отпуштају хормоне (тестостерон или естроген) у циљу маскулинизације или феминизације остатка организма. Дефинитивно, код гинандроморфних јединки циркулисање хормона не би могло бити ограничено само на једну страну организма, те следи закључак да је развој пола широко контролисан од стране бројних генетских чинилаца и да је сама ћелија аутономна (Zhao и сар., 2010).

У истраживањима која су уследила покушано је са интегрисањем ZW ћелија у гонаде са ZZ ћелијама и обратно. Међутим, пол се није мењао, што иде у прилог аутономности ћелији, односно говори да ћелија „зна свој пол и упорно га задржава“ (Zhao и сар., 2010). Аутори такође истичу да већа количина Z везаних гена додељује ћелији и ткиву карактеристике мужјака, с обзиром на то да код птица не постоји инактивација Z хромозома, као што постоји код сисара инактивација X хромозома, како би оба пола имала подједнаку количину X-везаних односно Z-везаних гена (Kuroda и сар., 2001; Melamed и Arnold, 2007). Чак и гени на Z хромозому, код којих постоји компетиција дозе, нису двоструко више експримирани када су присутна два Z хромозома (Ellegren и сар., 2007; Itoh и сар., 2007; McQueen и Clinton, 2009). Ипак, постоје и организми код којих соматске ћелије могу имати пол независно од гонада. И друге студије доказују да пол на нивоу саме ћелије може бити независан од развоја гонада (Agate и сар., 2003; Gahr, 2003; Scholz и сар., 2006; Smith и сар., 2007). Иако се пол

формира врло брзо по зачећу, те информације морају бити пренете до генетичког прекидача у самим гонадама што ће покренути развој тестиса или јајника. Бројни докази сугеришу да је тај окидач Z-везан DMRT1 ген (Smith, 2010).

Упркос свим разликама и птице тркачице и птице летачице сигурно имају такозвани геномски начин развијања пола, где полни хромозоми контролишу развиће мужјака или женки. Такође, ген(и) који учествују у развићу пола морају бити присутни код свих птица. С обзиром на изразиту хомологију Z хромозома код свих редова птица и недостатак великог броја гена на W хромозому, већа је вероватноћа да у развоју пола учествује само један механизам (Smith и сар., 2010), као што је то случај код сисара, него да је присутан већи број механизма, што се може наћи код еволутивно старијих организама, попут риба (Koorman и Loffler 2003; Volff и сар., 2003).

2.3. CHD ген - полиморфизам и значај у детерминацији пола птица

Код проучавања молекуларне еволуције гена, изузетно је тешко дефинисати идеални модел за изучавање због постојања врло значајног селекцијског притиска на гене који се јављају само у једној копији. Такви гени нису пожељни јер је тешко одредити параметар за поређење и исти гени су изложени различитом генетском окружењу. То представља проблем и код већине мултигених фамилија, било да су у питању гени на аутозомима или полно везани гени (Charlesworth, 1996). Гени који се налазе на нерекombинујућим деловима оба полна хромозома пружају могућност проучавања молекуларне еволуције истог гена изложеног различитим еволутивним силама, односно различитом геномском окружењу (Fridolfsson и Ellegren, 2000). Постоје значајне разлике у посматрању основних фактора који утичу на еволуцију полно везаних и гена на аутозомима. Пре свега, ефективна величина популације полно

везаних гена је увек мања од популације гена на аутозомима (Charlesworth и сар., 1987). Даље, гени на аутозомима проводе исто време код мужјака и код женки независно од односа полова самим тим што постоје код оба пола, а када су у питању полно везани гени – они могу бити у дисбалансу у случајевима поремећаја односа полова. Тако на пример, X хромозом сисара проводи 2/3 времена у женској линији. Такође, гени на нерекомбинујућим деловима полних хромозома се преносе искључиво преко једног пола, што значи да ће се евентуална мутација преносити само код тог пола (Miyata и сар., 1987). Код сисара бројна истраживања показују да је степен мутације испитиваних гена виши код мужјака него код женки, што је повезано са много већим бројем митотичких деоба герминативних ћелија током сперматогенезе у односу на оогенезу (Miyata и сар., 1987; Shimmin и сар., 1993; Ellegren и Fridolfsson, 1997). Треће, не постоје докази о хромозом-специфичној стопи мутације на аутозомима вертебрата (McVean и Hurst, 1997). Четврто, могући су ефекти количине хромозома или доминантног утицаја једног од полних хромозома на гене на полним хромозомима, те се и њихова стопа рекомбинације може разликовати (Charlesworth и сар., 1987).

Бројна проучавања структура које имају утицај на ДНК довела су до открића CHD гена код сисара 1993. године. Ген је дефинисан као високо конзервисан сегмент ДНК који код мишева кодира синтезу протеина величине 197kDa са SNF2 обрасцем хеликазног домена у свом централном региону, као и са још две изузетно битне функције. У циљу истицања три основне функције које поседује, протеин је назван CHD-1 (Delmas и сар., 1993).

Први домен CHD гена је хромо домен (C domain). Домен који није одлика само CHD протеина, већ су такви домени присутни и код других група протеина који учествују у кондензовању хроматина. Њихова основна улога јесте везивање хетерохроматина на хромоцентре и на теломере (Singh и сар., 1991), а механизми путем којих хромо домен

интерагује са хетерохроматином су још увек нејасни. Ови процеси се одигравају преко великих региона генома или на нивоу специфичних генских локуса и резултирају супресијом експресије гена (Shaffer и сар., 1993). Врло је интересантна чињеница да се CHD протеин ослобађа у цитоплазму у тренутку када ћелија улази у митозу и реинкорпорира се у хроматин током телофазе (односно цитокинезе). Таква активност CHD протеина додатно појачава веру у идеју да овај протеин, као и други протеини са хромо или хеликазно/АТР-азним доменима, игра значајну улогу у одређивању архитектуре хроматина (Stokes и Perry, 1995).

Хеликазно/АТР-азни домен (H) представља други значајни домен CHD протеина. Овај домен представља велику суперфамилију протеина са широким спектром функција, као што су репликација, рекомбинација и репарација ДНК, као и транскрипција, обрада и транслација РНК. H домен је врло сличан SNF2-related фамилији протеина. Садржи регион величине око 400 аминокиселина са 7 високо конзервисаних хеликазних домена (Eisen и сар., 1995). Постоји неколицина субфамилија *SNF2-related* гена али ни једна не поседује хромо домен нити DNK binding домен, као што је то случај код CHD гена. Претпоставља се да је основна функција *SNF2-related helicasey ATPase* домена постепено кретање дуж ДНК и дестабилизација протеин - ДНК интеракција (Pazin и Kadonaga, 1997).

Трећи домен - домен за везивање ДНК (D) је локализован у близини C терминалуса протеина, а везивање са ДНК се одиграва путем малих интеракција ужлебљивања са афинитетом за (AT)-богате делове ДНК. CHD протеин је једини познати протеин који садржи и C и H домен, а уједно и једини који уз та два домена има и способност везивања ДНК (Stokes и Perry, 1995).

Изузетно висока конзервисаност секвенци које кодирају синтезу CHD1 протеина код врста које су се пре најмање милијарду година одвојиле од својих најближих заједничких предака указује и на значај јаке очуваности њихове функције (Woodage и сар., 1997). Сличност CHD гена

миша и CHDW гена пилета су 82,9% на нивоу нуклеотида и 95,6% на аминокиселинском нивоу (Ellegren, 1996). Прецизније, поједина истраживања показују постојање врло малог броја аминокиселинских разлика између CHD1Z и CHD1W протеина неколицине проучаваних линија птица. Такође, између CHD гена птица и сисара постоје врло мале разлике. Поређењем хеликазног домена птица и сисара запажа се само једна аминокиселинска разлика, иако је величина региона 180 аминокиселина (Woodage и сар., 1997). Домен са ДНК везујућом активношћу је величине од 229 аминокиселина од којих је 11 кључно за везивање са АТ-богатим регионом нуклеинске киселине (Stokes и Perry, 1995), а код овог домена нема разлике између испитиваних сисара и птица (Fridolfsson и Ellegren, 2000). Верује се да мишеви поседују један ген (и неколико алелних форми) (Delmas и сар., 1993; Stokes и Perry, 1995), док птице имају два различита CHD гена и да је то вероватно последица различитог положаја унутар генома (Griffiths и сар., 1996).

Прве секвенце на W хромозому су откривене још 1982. године (Tone и сар., 1982). Међутим, CHD ген представља први откривени ген на W хромозому (Griffiths и Tiwari, 1995). Не дуго после овог открића, CHD ген је откривен и на Z хромозому (Griffiths и Korn, 1997). Секвенце су врло сличне, али CHDZ садржи додатни хидрофилни регион за 88 аминокиселина, богат глутаминском киселином и лизином (Griffiths и Korn, 1997). Иако код сисара полно везани парови гена врло брзо еволуирају, код CHD гена то није случај. CHD ген је присутан код свих (испитиваних) птица летачица (Neognathae). Међутим, када су у питању птице тркачице (Palaeognathae), CHDZ и CHDW гени нису откривени на полним хромозомима (Garcia-Moreno и Mindell, 2000). Вероватно да постоји CHD ген на полним хромозомима тркачица и да постоје два алела тог гена, али је мало вероватно да би се могли у скоријој будућности раздвојити и формирати CHDZ и CHDW (Griffiths и сар., 1998). Најраније раздвајање птица на Archaeornithes и Neornithes се десило пре 79 милиона година

(Sibley и сар., 1988) што значи да је CHD ген већ пре тога био на W хромозому. Истраживања фосила пица базирана на CHD гену говоре о раздвајању CHDZ и CHDW пре око 123 милиона година (Garcia-Moreno и Mindell, 2000). Поједини аутори износе и доказе о конзервисаности CHD гена код птица која траје и 300 милиона година (Benton, 1990)

CHD-Z секвенца је еволуирала око 20% брже него CHD-W секвенца (Ellegren и Fridolfsson, 1997; Kahn и Quinn, 1999). Бржа стопа еволуције је последица већег броја варијабилних места на CHD-Z него на CHD-W (Garcia - Moreno и Mindell, 2000).

CHDZ се преноси и преко мужјака и преко женки, па је очекивано да еволуира брже него CHDW. Такође је доказано да је еволуција CHDZ и CHDW текла независно, те да су CHDZ гени различитих врста птица сличнији међусобно, него CHDZ и CHDW гени исте врсте (Ellegren и Fridolfsson, 1997). Значајније конверзије гена и рекомбинација није било. Извршена су бројна истраживања у којима су се поредили гени птица, било анализама секвенце нуклеотида, било *Southern Blott* методом и сва су указала на то да су CHD гени птица високо конзервисани (Griffiths и сар., 1996). Такође, не постоје докази о евентуалним рекомбинацијама између CHDZ и CHDW гена, нити су откривене њихове копије на аутозомима (Fridolfsson и сар., 1998; Kahn и Quinn, 1999).

Прве анализе пола које су рађене помоћу CHD гена сусретале су се са озбиљним проблемом једнаке величине секвенци које се добијају након PCR. То је водило ка употреби полиакриламидних гелова, рестрикционих ензима и других прецизнијих техника које су онда детерминацију пола чиниле дугом, компликованом, неекономичном, напорном и не сасвим поузданом. Велики напредак представљало је увођење новог метода 1998. године који подразумева коришћење прајмера који се везују за високо конзервисани кодирајући егзонски део гена те долази до амплификације мање конзервисаног, некодиранијег, интронског дела. Такви амплификати су различите величине и могу се јасно разликовати након електрофорезе

на агарозном гелу (Griffiths и сар., 1998). Уз полиморфизам интронске секвенце на основу којег одређујемо пол јединке постоје и полиморфизми на нивоу CHDZ гена. С тога, можемо говорити о постојању више алелних CHDZ форми. Наведени полиморфизам представља потенцијални проблем, јер при амплификацији CHDZ гена можемо добити амплификате различите величине, те мушку јединку од које потиче узорак прогласити женком. Такве ситуације је потребно избећи коришћењем додатних W специфичних прајмера, коришћењем дуплекс PCR или прајмера који амплификују два потпуно различита интрона CHD гена, а не преклапајуће секвенце (Shizuka и Lyon, 2008; Casey и сар., 2009).

Полиморфизми интронског дела CHD управо омогућују детерминисање пола али су такође и специфични за сваку врсту, тј. можемо говорити о интерспецијском полиморфизму. Услед различитих еволутивних и генетских притисака на интронску секвенцу, она се мењала, те се на основу величине добијених продуката може одредити и која је врста птице у питању. Такође су доказане и интраспецијске варијације, односно полиморфизми, али су сада без већег значаја с обзиром да су изузетно мали и утврђени код малог броја врста (Lee и сар., 2010).

2.4. Апликативни аспекти анализе CHD гена и детерминације пола мономорфних, фармски узгајаних, дивљих и угрожених птица у утврђивању ефективне величине популација и њихове биоконзервације

Молекуларне технике базиране на анализи ДНК омогућавају брзо, поуздано и економично одређивања пола птица и представљају веома користан алат у различитим пољима истраживања. Разликовање пола је врло једноставан поступак код одраслих јединки диморфних врста. Међутим, када се ради о младунцима диморфних врста или о

моноформним јединкама свих узраста одређивање пола је углавном компликован и комплексан задатак (Morinha и сар., 2012).

Опште посматрано, технике одређивања пола првенствено имају две примене: при проучавању односа полова унутар популација и друго, при менаџменту програма очувања угрожених врста птица (Griffiths и сар., 1996). Међутим, анализе одређивања пола су значајан део бројних истраживања (Morinha и сар., 2012). Пол јединки потребно је знати при популационим проучавањима (Barrowclough и сар., 2011; Bush и сар., 2011), проучавањима понашања (Lewis и сар., 2002; Genovart и сар., 2008), процени начина формирања парова (Whittingham и Dunn, 2000; Wink и сар., 2011), унапређивањима програма очувања угрожених врста (Lens и сар., 1998; He и сар., 2005; Jensen и сар., 2011), менаџменту популација дивљих врста птица (Bosé и сар., 2007; Zhao и сар., 2009), анализама стратегија гајења у комерцијалном живинарству (Mine и сар., 2002; Batellier и сар., 2004), еволуционим проучавањима (Freed и сар., 2009; Suh и сар., 2011) али своју примену налазе и у форензици (An и сар., 2007). Илегална трговина птицама које се налазе на листи CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) је врло интензивна на територији југоисточне Европе и један сегмент борбе против такве трговине јесте и прецизна идентификација јединки, а део укупних информација о свакој јединки је и податак о полу.

Популациона проучавања представљају анализе групе јединки издвојених из одређене популације а да при томе деле неке карактеристике попут пола, старости, кондиције, здравственог стања и слично. При одабиру јединки за проучавање мора се водити рачуна да оне буду релевантне за постављени циљ. Такође, популациона проучавања су и један од најзначајнијих фактора при успостављању конзервационог статуса и ефикасних мера заштите одређене групе животиња. Поред старости и здравственог статуса, управо пол јединки (и однос полова унутар популације) представља један од значајнијих фактора који може

утицати на резултате популационих проучавања. Пол јединки је потребно знати пре свега због бројних разлика које између мужјака и женки постоје у фенотипу и физиологији како би се искључио евентуалан утицај пола на задате параметре. Однос полова унутар популације је врло значајан и може водити популацију у смеру повећавања или смањивања броја чланова (Krackow, 1995; Alonso-Alvarez, 2006). Познавање пола потребно је и за праћење динамике једне популације (Ramos и сар., 2009; Zhao и сар., 2009). Код проучавања структуре популација и предвиђања кретања популација најчешће је потребно установити пол јединки још на нивоу ембриона, а најкасније по изгледању јединки (Arnold и сар., 2003).

Унутар малих популација моногамних врста, заступљеност полова и утицај односа полова на демографске карактеристике могу повећати могућност изумирања врсте више него што је случај са полигамним системима (Legendre и сар., 1999; Bose и сар., 2007). Такође, могу имати утицај на ефективну величину популације повећавањем репродуктивне варијације међу јединкама (Anthony и Blumstein, 2000). Однос броја мужјака и женки на одређеном простору битан је за успех одржавања новооснованих популација (Sarrazin и Legendre, 2000). Још је Чарлс Дарвин забележио да је код већине врста животиња однос полова 1:1, али није разјаснио узроке те појаве. Према теоријама полне селекције Фишера (1930) и Тривера (1972), очекивано је да однос полова код моногамних врста птица буде уједначен при рођењу (Cockburn и сар., 2002). Код многих диморфних врста однос полова се креће у правцу продукције већег броја јединки пола који је мањи (Benito и Gonzalez-Solis, 2007). Различити притисци могу водити ка измењеном односу полова или повећаном морталитету једног од полова (Bradshaw и сар., 2003). Такође, познато је да је код моногамних врста птица оптималан однос полова 1:1, јер ће такав однос увећати стопу раста популације (Legendre, 2004). Код многих организама (нарочито када су у питању полигамне врсте), мужјаци поседују веће варијације у репродуктивном успеху него женке (Payne, 1979;

Arnold, 1994). Управо из тог разлога „успешни синови“ имају потенцијал да дају већи број потомака него „успешне ћерке“ (Whittingham и Dunn, 2000). До појаве молекуларних метода детерминације пола, развијено је неколико поузданих приступа одређивања односа полова (Clutton-Brock, 1986), али ни један није давао довољно добре резултате како би опстао поред молекуларних анализа.

При проучавању различитих облика понашања потребно је познавање пола јединке. Велики број врста поседује обрасце понашања карактеристичне само за ту врсту па је поређење са јединкама истог пола друге врсте често непримењиво. Познавање пола је значајно и на нивоу онтогенезе, када пратимо развиће пола и утицај пола на развој других органа (пре свега мозга) и касније на развој облика понашања (Cheng и Lehrman, 1975; Balthazart и Ball, 1995; Schlinger, 1998; Gahr, 2001; De Vries, 2004). Битно је и утврдити код ког пола се неки облик понашања прво јавља. Анализе пола су корисне код проучавања физиолошких облика понашања, код проучавања измењених физиолошких облика понашања и патолошких облика понашања (Lombardo и сар., 1994; Wagner, 1996; MacFarlane и сар., 2010). Значај имају управо због тога што је велики број облика понашања карактеристичан за пол и врсту (Owens, 2002). Када су птице у питању, вероватно највећа примена јесте код проучавања репродуктивног понашања и то пре свега родитељског понашања. Код врста где су оба родитеља укључена у бригу о исхрани младунаца, мономорфизам је заступљен код чак 90% врста (Lack, 1968). Анализе пола могу бити корисне и код проучавања хранидбеног понашања птица (Peters и Grubb, 1983), социјалне хијерархије унутар јата (Crook, 1964; Greenwood, 1980), проучавања опонашања облика понашања родитеља од стране младунаца (Cate, 1985; Cate и Vos, 1999; Slagsvold и сар., 2002) и деловања полних хормона на свеобухватно понашање птица (Adkins, 1978; Adkins и Pniewski, 1978). Пол птица је битан и при проучавању начина на који птице међусобно комуницирају (Schlinger, 1997; Volodin и сар., 2009).

Бројни обрасци понашања специфични су за један пол, док се код другог пола не јављају, јављају у другом облику или чак представљају патолошки облик понашања.

Деградација станишта, као и илегална трговина могу водити ка изумирању многих врста птица. Опстанак таквих врста зависи искључиво од правилног успостављања програма гајења у заточеништву. С обзиром на то, рана детерминација пола код оваквих јединки је један од кључних момената јер се на тај начин могу формирати и одвојити парови који ће дати највећи број оплођених јаја. Додатни проблем представља чињеница да је преко 60% угрожених врста птица мономорфно. Примена других техника, осим молекуларних, у већини случајева би водила ка додатном стресирању и угрожавању опстанка тих јединки (Bermudez-Humaran и сар., 2002). Такође је доказана веза између односа полова и демографије, понашања и опстанка популација, тако да код појединих врста није довољно имати само тачан број јединки, већ је потребан специфичан однос полова унутар истог простора за држање или одређене територије. Облици понашања попут полигамије, мултипле копулације, заштите партнера и заједнички узгој су често повезани са односима полова и највероватније су се развили као њихова последица (Murray, 1991). Одступања у односу полова имају утицај на екологију, мониторинг и конзервацију врста (Donald, 2007). С обзиром на то да се одабир јединки за формирање парова мора вршити на нивоу младунаца код којих полни диморфизам није још увек приметан чак и код диморфних врста, анализе пола су и у тим случајевима веома корисне (Vučićević и сар., 2012c; Vučićević и сар., 2012d). Пол птица је неопходно одредити и за потребе вештачког осемењавања у програмима очувања угрожених и заштићених врста птица, (D'Aloia и Paul Eastham, 2000).

Када се говори о комерцијалном живинарству, одређивање полова је битно за поједине производне категорије. Међутим, оно што ограничава примену молекуларно генетичких метода за ове потребе јесте цена

анализе која углавном вишеструко превазилази вредност јединке, али и потреба да се пол одреди веома брзо. Сексирање пилића на основу морфолошких карактеристика клоаке је метода које се примењује у живинарству скоро један век (Hochbaum 1942; Lun, 1948; Bramwell, 2003) и управо због брзине добијања резултата и готово никаквог материјалног утрошка истискује сваки други савременији и поузданији метод. Однос полова представља карактеристику једне популације, али исто тако варира од врсте до врсте. За производњу јаја користе се само женске јединке, док се за производњу меса користе и мушке и женске јединке. Код мужјака, конверзија и прираст су бољи и било би идеално када би само они били коришћени у производњи. У последњој деценији приметан је напредак на пољу репродуктивне биотехнологије, са фокусом на унапређењу вештачког осемењавања, *in vitro* фертилизације и манипулације ембрионима (Escriva и сар., 2002) у циљу мењања односа полова зарад повећања профита. Молекуларне методе могу наћи примену и код гајења украсних раса живине или у програмима гајења високовредних јединки, када још на нивоу ембриона одређујемо пол. Код комерцијалног гајења украсних птица различита средства се улажу у одгој мужјака у односу на женке, а самим тим се и вредност тих птица на тржишту разликује у зависности од пола. Самим тим, погрешна процена пола може проузроковати значајне економске губитке (Cerit и Avanus, 2006; Brubaker и сар., 2011).

Код животиња, разлике на нивоу гонада су често праћене упадљивим разликама на нивоу секундарних полних карактеристика, што је значајно за еволутивна проучавања (Badyaev, 2002). Постоји велики број проучавања еволуције и еволутивних односа птица, али и поред тога око ових тема постоје и бројна спорења (Chojnowski и сар., 2008). Реконструисање сложених еволутивних односа међу птицама је доста тешко, највероватније услед брзих раздвајања линија у њиховој раној еволутивној историји (Feduccia, 1995) што је резултирало постојањем

многих удаљених, морфолошки кохезивних група са неколико постојећих интермедијарних форми које их повезују у друге дефинисане групе. Добар део еволутивних студија је заснован на анализама полних хромозома. Раздвајање полних хромозома птица и сисара се десило пре око 310 милиона година (Fridolfsson и сар., 1998) док су се птице од двоножних диносауруса одвојиле у доба јуре, пре 199, односно 145 милиона година (Forster и сар., 1998). Иако су код сисара углавном разјашњени механизми развоја пола и еволуција полних хромозома, код птица још увек представљају велику непознаницу. У бројним проучавањима еволуција сисарских полних хромозома се упоређује са еволуцијом полних хромозома птица. Међутим, хипотеза о доминантној улози W хромозома при развоју пола није доказана, нити су доказане хипотезе по којима је пол зависан од броја Z хромозома, тј. количине гена које они носе (Ellegren, 2000; Smith и Sinclair, 2004), као ни хипотеза по којој свака ћелија „зна свој пол“ те је независна од деловања полних хормона (Zhao и сар., 2010). Додатну компликацију представљају и птице тркачице које су еволутивно старије од летачица. Анализирањем висококонзервисаних, полно везаних секвенци може се и одређивати пол јединке али и процењивати њихово присуство код удаљених врста, односно редова птица, те на основу тога формирати филогенетске односе (García - Moreno и Mindell, 2000). Анализе пола птица уско су везане са проучавањима полно везаних секвенци и управо и јесте циљ пронаћи висококонзервисане секвенце које су присутне код свих птица како би могле служити као универзални молекуларни маркер за детерминацију пола, а да се на основу њихових карактеристика може проучавати и еволутивни однос врста. Механизми детерминације пола могу утицати и на однос полова (West и Sheldon 2002), те су због тога значајни за еволуциону екологију (Charlesworth и Mank, 2010).

Криволов и илегалан транспорт су изузетна претња опстанку великом броју угрожених врста птица. Ипак, због свог егзотичног изгледа и велике вредности на тржишту птице су често предмет оваквих незаконитих активности. Мада већина земаља поседује законске механизме којима штити заштићене врсте и помоћу којих се бори против оваквих појава, у пракси се они ипак не спроводе како је предвиђено. Према подацима Интерпола (*International Policing Organisation*) илегална трговина биљкама и животињама као и њиховим производима расте на глобалном нивоу из године у годину, а вредност тог црног тржишта процењена је на око 20 милијарди долара годишње (Interpol). Организоване криминалне групе кријумчаре животиње углавном добро утврђеним рутама које служе за пренос наркотика (Cook и сар., 2002; Warchol, 2004). Илегална трговина животињама је популарна преваходно из разлога што доноси већу зараду него кријумчарење наркотика или оружја, а носи значајно мањи ризик уз ниже законске казне (Leader-Williams и Milner-Gulland, 1993; Claridge и сар., 2005; Alacs и Georges, 2008; Li и сар., 2009). Из свега наведеног, јасно је да илегална трговина дивљим врстама птица цвета и да се тиме врши додатни притисак на угрожене врсте птица (Alacs и сар., 2010). Илегална трговина дивљим врстама птица представља директно и индиректно, озбиљну претњу за глобални биодиверзитет. Врсте којима се тргује на црном тржишту изложене су прекомерној експлоатацији која је подстакнута преувеличаном новчаном вредношћу ретких врста. Управо на том нивоу се појављује *circulus vitiosus* јер што врста постаје малобројнија, то јединкама те врсте расте цена чинећи их још пожељнијим објектом трговине (Courchamp и сар., 2006). Прекомерна експлоатација одређене врсте може водити ка њеном истребљењу са датог локалитета. Међутим, уколико трговина узме маха на већем броју подручја, постоји ризик и од глобалног истребљења. Нарочит ризик постоји по врсте које су осетљивије због кратког животног века, високе природне ране смрти младунаца, слабе репродуктивности и сл.

(Alacs и сар., 2010). Директна експлоатација јединки зарад лова, трговине и колекционарства представља други по величини угрожавајући фактор по угрожене врсте (одмах иза уништавања природних станишта), утичући на 30% угрожених врста птица (*International Union for Conservation of Nature - IUCN*). Илегална трговина дивљим животињама такође носи и могућност интродукције егзотичних животиња у средине где их до тада није било. То представља опасност, јер такве јединке можда представљају предаторе за врсте које су већ живеле на том станишту (Normile, 2004), или могу са собом носити узрочнике различитих инфективних болести (Smith и сар., 2006). Током последњих десетак година значајну улогу у области идентификације птица при трговини имају молекуларне технике базиране на анализи ДНК. Те технике се могу поделити у оне које омогућавају одређивање врсте и оне које служе за одређивање пола на основу гена на полним хромозомима (An и сар., 2007). Управо због великог броја врста које се лове противно закону, значајно је пронаћи полно специфични ген који ће послужити као универзални молекуларни маркер за одређивање пола и врсте птица (Lee и сар., 2010). Такође, у појединим земљама лов је ограничен само на један пол током једног дела сезоне или током читаве сезоне и контрола такве регулативе захтева недвосмислено одређивање пола уловљене животиње (An и сар., 2007; Alacs и сар., 2010).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА

Циљ овог рада је процена могућности примене CHD гена као универзалног молекуларног маркера у детерминацији пола птица уз компарацију метода коришћених током експеримента како би се дефинисала најпогоднија метода за одређивање пола птица.

До постављеног циља долази се реализацијом следећих задатака:

1. Формирати репрезентативан узорак већег броја редова птица;
2. Узорковати различите типова узорака (крв, перо, брис, фецес, формалински исечци у парафину) и упоредити различите протоколе за изолацију ДНК из различитих типова узорака;
3. Извести PCR амплификацију CHD гена, коришћењем 2550F/2718R сета прајмера и упоредити примењене методе;
4. Визуелизовати PCR продукте путем електрофорезе на агарозном гелу и одредити пол узоркованих јединки анализом величине трака, односно амплификованог CHD гена Z и W хромозома;
5. Проценити универзалност CHD гена као молекуларног маркера за анализу пола узоркованих врста птица различите филогенетске позиције на основу добијених резултата;
6. Статистички обрадити податке.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Материјал

Узорци су прикушљани у периоду јануар 2010. године – јун 2012. године. Набављани су из Зоолошког врта у Београду, зоолошког врта из Индонезије, из колекција приватних одгајивача птица из Србије и иностранства (Аустрија, Босна и Херцеговина, Македонија, Хрватска) и од Катедре за патолошку морфологију, Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду. При одабиру се тежило узорковању биолошког материјала од мономорфних врста птица или младунаца диморфних врста.

Узорци потичу од 550 јединки (83 врсте из 15 редова). Списак редова и врста из којих потичу птице од којих су узимани узорци, као и број узорака сваке врсте дат је у Табели 1.

Перје је узорковано од укупно 460 јединки, крв од 15 јединки, брис усне душље од 29 јединки, фецес од 20 јединки и ткивни формалински исечци различитих врста ткива од 15 јединки.

Узорковање је вршено са циљем да се обухвати што већи број представника сваке врсте и што више врста сваког узоркованог реда.

Торакална пера су узоркована уз поштовање процедура за избегавање контаминације, деградације и мешања узорака (коришћење рукавица и њихово мењање након узорковања сваке птице, избегавање додиривања базалног дела пера где се налазе ћелије чијом се лизом ослобађа ДНК која се анализира и сл.). Од сваке птице узоркована су два до три пера, која су затим смештена у коверте или кесице са клизним

затварачем обележене бројевима специфичним за сваку јединку и чуване на -20°C до момента изолације ДНК.

Брис усне дупље узоркован је коришћењем стерилног штапића са ватом, водећи рачуна да птица претходно није јела, како би се избегла контаминација узорка. Брисеви су добро осушени на собној температури и смештени у епрувете које су обележене бројевима специфичним за сваку јединку и чувани на -20°C до момента изолације ДНК.

Крв је узоркована засецањем врха нокта. Нокат се претходно дезинфиковао а након засецања, кап крви је упијена ватом стерилног штапића. Након тога, вата штапића се сушила, штапић са ватом смештао у епрувету, обележавао и чувао на температури замрзивача до тренутка изолације ДНК. Од појединих птица крв је узоркована и на тај начин што се након засецања нокта 2-3 капи крви наносило у епрувету са антикоагулансом, епрувета се обележавала и након тога чувала на температури $+4^{\circ}\text{C}$ до тренутка изоловања ДНК. За заустављање крварења су се користили физичка компресија и препарати на бази сребро нитрата.

Фецес је узоркован одмах након дефецирања од птица које су се држале издвојено, саме у кавезима. Стерилним пластичним штапићем је узимана мала количина фецеса величине $5 \times 5\text{ mm}$, смештана у епрувету и одмах прослеђивана на изолацију нуклеинских киселина.

Ткива коришћена за прављење ткивних формалинских исечака су потицала од јединки које су достављане Катедри за патолошку морфологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду у циљу дијагностиковања болести, односно нису жртвоване зарад овог испитивања. Листићи су добијани сечењем парафинских блокова помоћу микротома LEICA RM 2235 (Leica Microsystems, Germany) на ткивне исечке дебљине $5\mu\text{m}$. Након исецања, листићи су стављани у петри плоче, обележавани и чувани на собној температури до тренутка изоловања ДНК.

Експеримент је обављен у Лабораторији за генетику животиња, на Катедри за биологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, у оквиру пројекта “Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране” (Ев. бр. 46002, руководилац проф. др Зоран Станимировић) и на Катедри за болести копитара, месоједа, живине и дивљачи Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

4.2. Методе

4.2.1. Изолација ДНК из различитих типова ткива птица

4.2.1.1. Изолација ДНК из перја

ДНК из базе пера изолована је помоћу комерцијалних сетова за изолацију нуклеинских киселина:

- „DNeasy® Blood & Tissue Kit” (Cat. No 69504, Qiagen, Valencia, CA, USA) по прилагођеном протоколу произвођача (Purification of total DNA from nails, hair or feathers - User-Developed protocol) и
- „KAPA Express Extract Kit” (Cat. No KK7152, Kapa Biosystems, Cape Town, South Africa).

Протокол за изолацију ДНК из пера помоћу сета „DNeasy® Blood & Tissue Kit” укључивао је следеће кораке:

1. Исечен је базални део осовине пера (каламус) дужине 2-5 mm и смештен у епрувету запремине 1,5 ml. Од сваке јединке коришћена су по 2-3 пера како би се изоловала довољна количина ДНК;
2. Свака епрувета је преливена течним азотом и потапана у њему све док течни азот није испарио, у циљу смањења времена потребног за лизу

узорка (до 20 минута), јер течни азот омогућава лакше пуцање ћелијске и једарне мембране.

3. У епрувету је додато 300 μ l пуфера ATL, 20 μ l протеиназе К и 20 μ l претходно припремљеног воденог раствора 1M DTT. Садржај епрувете је вортексован 10 секунди;

4. Епрувета је инкубирана на 56° C у воденом купатилу, уз повремено вортексовање, док узорак није био потпуно лизиран, што је визуелно утврђено (време лизе варира у зависности од величине пера);

5. Следи вортексовање епрувете у трајању од 15 сек, након чега је у њу додато 300 μ l пуфера AL и 300 μ l етанола, при чему је после сваког додавања извршено вортексовање, како би се добио хомогени раствор;

6. Садржај епрувете је премештан у DNeasy Mini spin колону смештену у прикупљајућој епрувети запремине 2 ml и филтриран центрифугирањем 1 минут на $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Након центрифугирања су одбачени филтрат и прикупљајућа епрувета;

Кораци 5. и 6. имају за циљ селективно везивање ДНК за DNeasy мембрану при чему филтрат пролази кроз мембрану за време центрифугирања.

7. DNeasy Mini spin колона је премештена у нову прикупљајућу епрувету запремине 2 ml, у колону је додато 500 μ l пуфера AW1 и садржај епрувете је филтриран центрифугирањем 1 минут на $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm), након чега су одбачени филтрат и прикупљајућа епрувета;

8. DNeasy Mini spin колона је премештена у нову прикупљајућу епрувету запремине 2 ml, у колону је додато 500 μ l пуфера AW2 и садржај епрувете је филтриран центрифугирањем 3 минута на 20 000 $\times g$ (13 000 rpm), након чега су одбачени филтрат и прикупљајућа епрувета;

Кораци 7. и 8. имају за циљ испирање DNeasy мембране чиме се уклањају преостали контаминанти и ензимски инхибитори.

9. DNeasy Mini spin колона је премештена у чисту епрувету запремине 1,5 ml, а затим је додато 200 μ l пуфера AE директно на DNeasy

мембрану. Епрувета је инкубирана на собној температури 1 минут, а затим је садржај центрифугиран 1 минут на $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm).

Циљ овог корака је спирање ДНК са DNeasy мембране;

10. DNeasy Mini spin колона је одбачена, а елуат у епрувети запремине 1,5 ml садржао је изоловану ДНК која је чувана на -20°C до употребе у PCR реакцији.

Протокол за изолацију ДНК из пера помоћу сета „КАРА Express Extract Kit” (Cat. No KK7152, Кара Biosystems, Cape Town, South Africa) укључивао је следеће кораке:

1. Исецан је базални део осовине пера (каламус) дужине 2-5 mm и смештен у епрувету запремине 1,5 ml. Од сваке јединке коришћена су по 2-3 пера како би се изоловала довољна количина ДНК;
2. Свака епрувета је преливена течним азотом и потапана у њему све док течни азот није испарио; Корак има за циљ смањење времена потребног за лизу узорка (до 20 минута), с обзиром да течни азот омогућава лакше пуцање ћелијске и једарне мембране.
3. У епрувету је додато 50 μl 1x КАРА Express Extract пуфера и 2 μl КАРА Express Extract ензима. Епрувета је вортексована 10 sek;
4. Инкубациони корак протокола је омогућио лизу ткива (од 10 до 30 минута на 75°C) и инактивацију термостабилне КАРА Express Extract протеазе (5 минута на 95°C);
5. Садржај епрувете је вортексован 10 sek и потом центрифугиран 1 минут на 13 000 rpm;
6. Након центрифугирања, 50 μl ДНК изолата (супернатанта) је пребачено у нову епрувету запремине 1,5 ml;
7. Тако добијен изолат ДНК разређен је у ТЕ пуферу у односу 1:5 и чуван на -20°C до употребе у PCR реакцији.

4.2.1.2. Изолација ДНК из крви

Изолација ДНК из крви вршена је помоћу комерцијалних сетова:

- „DNeasy® Blood & Tissue Kit” (Cat. No 69504, Qiagen, Valencia, CA) по прилагођеном протоколу произвођача (Purification of total DNA from nails, hair or feathers - User-Developed protocol) и
- „КАРА Express Extract Kit” (Cat. No KK7152, Кара Biosystems, Cape Town, South Africa).

Протокол за изолацију ДНК из крви помоћу сета „DNeasy® Blood & Tissue Kit” укључивао је следеће кораке:

1. У епрувету запремине 1,5 ml пипетира се 5-10 μ l некоакулисане крви, 20 μ l протеиназе К и воде до 200 μ l;
2. Затим се додаје 200 μ l АL пуфера. Следе вортексовање од 5 секунди и инкубација у воденом купатилу у трајању од 10 минута на температури од 56° С, уз повремено вортексовање;
3. Епрувета је вортексована 15 сек, затим је у њу додато 200 μ l етанола, при чему је уследило вортексовање, како би се хомогенизовао раствор;
4. Садржај епрувете је пребачен у DNeasy Mini spin колону смештену у прикупљајућој епрувети запремине 2 ml и филтриран центрифугирањем 1 минут на $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Након центрифугирања одбачени су филтрат и прикупљајућа епрувета;

Кораци 3. и 4. имају за циљ селективно везивање ДНК за DNeasy мембрану при чему филтрат пролази кроз мембрану за време центрифугирања.

5. DNeasy Mini spin колона је премештена у нову прикупљајућу епрувету запремине 2 ml, у колону је додато 500 μ l пуфера АW1 и садржај епрувете је филтриран центрифугирањем 1 минут на $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm), након чега су одбачени филтрат и прикупљајућа епрувета;

6. DNeasy Mini spin kolona je premештена у нову прикупљајућу епрувету запремине 2 ml, у колону је додато 500 μ l пуфера AW2 и садржај епрувете је филтриран центрифугирањем 3 минута на 20 000 \times g (13 000 rpm), након чега су одбачени филтрат и прикупљајућа епрувета;

Кораци 5. и 6. имају за циљ испирање DNeasy мембране чиме се уклањају преостали контаминанти и ензимски инхибитори.

7. DNeasy Mini spin kolona je premештена у чисту епрувету запремине 1,5 ml, а затим је пипетирано 200 μ l пуфера АЕ директно на DNeasy мембрану. Садржај епрувете је инкубиран на собној температури 1 минут, а затим центрифугиран 1 минут на $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm);

Циљ овог корака је спирање ДНК са DNeasy мембране.

8. DNeasy Mini spin kolona je одбачена, а елуат у епрувети запремине 1,5 ml садржао је изоловану ДНК која је чувана на -20° C до употребе у PCR реакцији.

Протокол за изолацију ДНК из крви помоћу сета „КАРА Express Extract Kit” (Cat. No KK7152, Кара Biosystems, Cape Town, South Africa) укључивао је следеће кораке:

1. Након засецања нокта, стерилни штапић са ватом је прислањан и упијене су 2-3 капи крви. Врх штапића са натопљеном ватом се одсецао и смештао у епрувету од 1,5 ml;
2. У епрувету је додато 300 μ l 0,5 \times КАРА Express Extract пуфера након чега је уследило вортексовање током 10 sek;
3. Инкубациони корак протокола је омогућио лизу ћелија крви (22 минута на 75° C) и инактивацију термостабилне КАРА Express Extract протеазе (5 минута на 95° C);
4. Садржај епрувете је вортексован 10 sek, а затим центрифугиран 1 минут на 13 000 rpm;

5. Након центрифугирања врх штапића са ватом се бацао, а 50 μ l ДНК изолата (супернатанта) је пребациван у нову епрувету запремине 1,5 ml;
6. Тако добијен изолат ДНК разређен је у ТЕ пуферу у односу 1:5 и чуван на -20° C до употребе у PCR реакцији.

4.2.1.3. Изолација ДНК из бриса усне дупље

ДНК из бриса усне дупље изолована је помоћу комерцијалног сета „КАРА Express Extract Kit“ (Cat. No KK7152, Кара Biosystems, Cape Town, South Africa) по протоколу који је укључивао следеће кораке:

1. У епрувету запремине 1,5 ml пипетирано је 300 μ l 0,5 x КАРА Express Extract пуфера;
2. Исечен је део штапића са ватом и смештен у епрувету чији је садржај затим вортексован 10 sek;
3. Инкубациони корак протокола је омогућио лизу ткива (од 15 минута на 75° C) и инактивацију термостабилне КАРА Express Extract протеазе (5 минута на 95° C);
4. Садржај епрувете је вортексован 10 sek, а затим центрифугиран 1 минут на 13 000 rpm;
5. Након центрифугирања, брис је одстрањен из епрувете, а 50 μ l ДНК изолата је пребачено у нову епрувету запремине 1,5 ml;
6. Тако добијен изолат ДНК разређен је у ТЕ пуферу у односу 1:5 и чуван на -20° C до употребе у PCR реакцији.

4.2.1.4. Изолација ДНК из фецеса

Изолација ДНК из фецеса вршена је помоћу комерцијалног сета „КАРА Express Extract Kit“ (Кара Biosystems, Cape Town, South Africa) по следећем протоколу:

Изолација ДНК из фецеса вршена је помоћу комерцијалног сета „КАРА Express Extract Kit” (Cat. No KK7152, Кара Biosystems, Cape Town, South Africa) по следећем протоколу:

1. У епрувету запремине 1,5 ml ставља се фецес птице (5x5 mm) након чега се прелива са 300 μ l 0,5 x КАРА Express Extract пуфера и 2 μ l КАРА Express Extract ензима. Садржај епрувете је вортексован 10 sek;
2. Следи инкубирање епрувете и лиза ткива на 75° C током 20 минута и на 95° C током 5 минута током чега долази до инактивације термостабилне КАРА Express Extract протеазе;
3. По инкубацији, садржај епрувете се вортексује 10 sek и потом центрифугује 1 минут на 13 000 rpm;
4. Након центрифугирања, брис је одстрањен из епрувете, а 50 μ l ДНК изолата је пребачено у нову епрувету запремине 1,5 ml;
5. Добијен изолат ДНК разређен је у ТЕ пуферу у односу 1:5 и чуван на -20° C до употребе у РСР реакцији.

4.2.1.5. Изолација ДНК из ткивних формалинских исечака

Из формалинских ткивних исечака изолација ДНК је вршена применом комерцијалног сета „КАРА Express Extract Kit” (Cat. No KK7152, Кара Biosystems, Cape Town, South Africa) по следећем протоколу:

1. Из припремљених листића ткива дебљине 5 μ m у петри плочама се исеца ткиво помоћу скалпела, како би се што је више могуће парафина издвојило и добио што већи удео ткива у узорку. Издвојено ткиво се смешта у епрувету запремине 1,5 ml
2. Узорак се прелива са 100 μ l 1 x КАРА Express Extract пуфера и 2 μ l КАРА Express Extract ензима. Епрувета је вортексована 10 sek;

3. Следи инкубација узорка и лиза ткива на 75° С током 22 минута и на 95° С током 5 минута током чега долази до инактивације термостабилне КАРА Express Extract протеазе;
4. По инкубацији, садржај епрувете се вортексује 10 сек и потом центрифугује 1 минут на 13 000 rpm;
5. Након центрифугирања 50 µl ДНК изолата је пребачено у нову епрувету запремине 1,5 ml;
6. Добијен изолат ДНК разређен је у ТЕ пуферу у односу 1:5 и чуван на -20° С до употребе у РСР реакцији.

При изолацији ДНК из свих коришћених типова ткива птица, инкубација је вршена у воденом купатилу (Thermomixer comfort, Eppendorf, Germany), центрифугирање узорка помоћу центрифуге Hettich zentrifugen Mikro 20 (D-78532; Hettich Lab Technology, Germany), вортексовање применом мешалице (модел EV-100, Tehnica Železniki, Slovenia). За пипетирање узорка коришћене су аутоматске пипете (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl Eppendorf, Germany). Узоркована ткива птица и изолована ДНК су чувани на температури од -20° С у замрзивачу, F6311W (Gorenje, Slovenia).

4.2.2. Амплификација CHD гена

4.2.2.1. Амплификација CHD гена применом Таq ДНК полимеразе

У циљу даљег анализирања жељених фрагмената ДНК, потребно је повећати њихову количину. То је постигнуто амплификацијом током реакције ланчане полимеразе (PCR реакција) уз примену специфичних прајмера. Коришћени су прајмери 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') и 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') (Fridolfsson и Ellegren, 1999). Овај пар прајмера ограничава интрон који је, код већине врста птица, краћи на W

хромозому него на Z хромозому, што омогућава амплификацију сегмента од око 600 bp на CHD-Z гену и сегмента од око 450 bp на CHD-W гену.

Смеша за извођење PCR-а припремана је у микротубама запремине 0,2 ml и била је следећег састава: 1 x reaction buffer (Кара Biosystems), 1.5 mM MgCl₂, 100 μM dNTP (Кара Biosystems), 0.05 U/μl Taq polymerase (Кара Biosystems) и 1 μM сваког од прајмера из сета 2550F/2718R (Invitrogen, Carlsbad, CA). Реакција је извођена са 10 μl изоловане ДНК из коришћеног узорка. Укупна запремина реакционе смеше износила је 20 μl.

Термални профил је оптимизован тако да се постигну најбољи резултати применом наведених компоненти. Амплификација је обављена у PCR уређајима Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany) и MultiGene Gradient (Labnet International Inc., USA) по програму:

- 1) Почетна денатурација на 95° C током 4 минута;
- 2) Денатурација на 95° C током 30 секунди;
- 3) Хибридизација на 55° C током 30 секунди;
- 4) ДНК екстензија на 72° C током 45 секунди;

Кораци 2, 3 и 4 су поновљени 34 пута (укупно 35 циклуса).

- 5) Финална екстензија ДНК на 72° C током 4 минута.

Код узорака код којих наведени метод није дао задовољавајуће резултате (неуспеле реакције или нејасни резултати) прибегло се оптимизацији параметара реакције, односно промени температуре хибридизације. Градијентни PCR је извођен на уређају MultiGene Gradient (Labnet International Inc., USA), а температуре хибридизације су се кретале у опсегу од 50 до 60° C (50° C, 50.5° C, 51.1° C, 52.4° C, 53.9° C, 55.3° C, 56° C, 57.3° C, 58.4° C, 59.4° C, 59.7° C и 60° C). Компоненте PCR смеше и остали параметри термалног профила реакције су остали непромењени.

Додатне оптимизације датог протокола биле су неопходне код узорака пореклом од врсте *Alopochen aegyptiacus* (египатска утва) с обзиром да за ту врсту нису постојали литературни подаци а да добијени амплификати након градијентног PCR-а нису били јасно видљиви.

Реамплификација је вршена амплификатом добијеним на температури хибридизације од 51.1° C. У односу на основни протокол, концентрација MgCl₂ је смањена на 1 mM као и концентрација прајмера 2550F/2718R на 0,8 μM. Концентрације PCR пуфера, dNTP и *Taq* полимеразе су остале непромењене. Параметри термалног профила су остали неизмењени уз смањење броја циклуса на 25.

4.2.2.2. Амплификација CHD гена применом модификоване *Taq* ДНК полимеразе дизајниране да буде отпорна на инхибиторе PCR

PCR реакциона смеша припремљена је коришћењем комерцијалног сета КАРА2G Robust HotStart ReadyMix према модификованим упутствима произвођача. Реакциона смеша запремине 25 μl је садржала: 12.5 μl КАРА2G Robust HotStart ReadyMix (2X), 1.25 μl сваког прајмера (2550F и 2718R) и 10 μl изоловане ДНК. Реакција ланчане полимеразе се одвијала у PCR апаратима Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany) и MultiGene Gradient (Labnet International Inc., USA) по програму:

- 1) Почетна денатурација на 95° C током 3 минута;
- 2) Денатурација на 95° C током 15 секунди;
- 3) Хибридизација на 52° C током 15 секунди;
- 4) ДНК екстензија на 72° C током 15 секунди;

Кораци 2, 3 и 4 поновљени су 44 пута (укупно 45 циклуса).

- 5) Финална екстензија ДНК на 72° C током 8 минута.

КАРА2G Robust HotStart ReadyMix (2X) садржи КАРА2G Robust HotStart ДНК полимеразу у одговарајућем реакционом пуферу, сва четири dNTP-а (0.2 mM сваког dNTP-а, 1X), MgCl₂ (2 mM, 1X) и стабилизаторе.

КАРА2G Robust ДНК полимеразе је специјално дизајнирана полимеразе која обезбеђује већу процесивност и виши ниво толеранције на уобичајене PCR инхибиторе него wild-type *Taq* полимеразе. У „hot start“ формулацији, КАРА2G Robust ДНК полимеразе је у комбинацији са

специфичним антителом које инактивира ензим до првог корака денатурације. То спречава елонгацију прајмер – темплат комплекса који настају као резултат неспецифичног везивања прајмера у току иницијалне денатурације и повећава укупну ефикасност реакције. КАРА2G Robust HotStart ДНК полимераза има 5'-3' полимеразну и 5'-3' егзонуклеазну активност, али нема 3'-5' егзонуклеазну – коригујућу активност. Верност КАРА2G Robust HotStart ДНК полимеразе је слична оној коју има wild-type *Taq* полимеразе. Стопа погрешног уграђивања нуклеотида је приближно једна грешка на 1.7×10^5 инкорпорисаних нуклеотида.

4.2.3. Електрофореза и визуелизација РСР продуката

Продукти РСР амплификације су раздвојени електрофорезом на агарозном гелу. Електрофореза се темељи на различитој брзини кретања молекула ДНК различитих величина у агарозном гелу под утицајем електричног поља. Молекул ДНК је негативно наелектрисан и у електричном пољу се током електрофорезе креће према аноди. Однос молекулске масе и наелектривања молекула је константан те се молекули кроз гел крећу брзином која зависи само од њихове величине. Молекули мање молекулске масе крећу се брже кроз гел, док се они са већом молекулском масом крећу спорије.

Двопроцентни агарозни гел је припремљен растварањем 0,8 g агарозе (Serva - Agarose Serva for DNA Electrophoresis Analytical Grade, Germany) у 40 ml 1x TBE пуфера (Tris-borat, EDTA). Агароза се кува у TBE пуферу 90 секунди на 450W (у микроталасној пећници Whirlpool модел М 541) и затим хлади ротацијом магнета на магнетној мешалици (VELP scientifica - ARE Heating magnetic stirrer, VЕLP scientifica, Italy) до температуре прихватљиве за хватање посуде руком. Следи разливање гела у кадицу електрофорезе у коју је претходно постављен чешаљ за формирање базенчића у гелу и хлађење током десетак минута на собној температури.

По очвршћавању гела у сваки бунарчић је нанешена смеша 2,5 μ l PCR продукта и 1 μ l боје 6x Loading Dye Solution (Fermentas) направљена на парафилму. У граничне бунарчиће је нанешено 2 μ l масеног маркера (O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas, USA) који је такође претходно помешан на парафилму са 1 μ l боје. Гел је преливан са 50 ml 1x TBE пуфера. Електрофореза се одвијала при струји јачине 50 mA и напону од 50 V у трајању од 45 минута (Carl ROTH N817.1 minieasy Electrophoresis Unit, Carl Roth, Germany).

Као негативна контрола је коришћена инјекциона вода, док су као позитивна контрола коришћени амплификати друге јединке врсте која се испитује или јединке врсте *Ara ararauna* (жуто плава ара) којој је претходно утврђен пол, уколико до тада нисмо одређивали пол код те врсте.

За визуелизацију молекула ДНК у гелу коришћен је етидијум бромид који се интеркалира између ланаца ДНК молекула и флуоресцира када се осветли UV светлом. Визуелизација молекула ДНК у агарозном гелу омогућена је бојењем гела након електрофорезе у раствору 20 μ l етидијум бромида у 200 ml дестиловане воде, током 15 минута. Обезбојавање гела је вршено дестилованом водом током 10 минута и након тога гел је постављен под UV светло трансилуминатора (Vilber Lourmat – ETX-20.C 254 nm, Vilber Lourmat, France) и фотографисан како би се добио трајни запис резултата електрофоретске анализе. Пол сваке јединке детерминисан је визуелним прегледом дигиталне слике гела. Јединке са две траке на гелу (амплифицирани фрагменти Z и W хромозома) детерминисане су као женке, а оне са једном траком као мужјаци (амплифицирани фрагменти Z хромозома) или женке (преференцијално амплифицирани фрагменти W хромозома, недетектовани фрагменти Z хромозома) у зависности од положаја траке на гелу, односно дужине амплифицираних фрагмената (око 600bp за мужјака, око 450bp за женку).

5. РЕЗУЛТАТИ

Одређивање пола птица је рађено код 550 јединки пореклом од 83 врсте из 15 редова. Перје је узорковано од 460 јединки, крв од 15 јединки, брис усне душље од 29 јединки, фецес од 20 јединки и ткивни формалински исечци различитих ткива птица од 15 јединки. Узорковање се вршило са циљем да се обради што већи број представника сваке врсте и што више врста сваког узоркованог реда.

Применом 2550F/2718R сета прајмера одређивање пола је успешно извршено код 74 врсте. Код 9 врста (*Anser indicus*, *Branta canadensis*, *B. sandvicensis*, *Bubo bubo*, *Casuaris casuaris*, *Dromaius novaehollandiae*, *Eudocimus ruber*, *Ramphastos cuculifer*, *Rhea americana*) није било могуће одредити пол без обзира на то што су добијени амплификовани сегменти CHD гена након PCR реакције.

Од 539 покушаја детерминације пола, успешних је било 487 (90,97%), док код 52 узорка (9,03%) није добијен резултат. Покушај детерминације пола извршен је код 83 врсте из 18 редова. Пол је детерминисан код 89,16% (74) врста и 72,22% (13) редова. Статистички врло значајно више ($\chi^2=326,901$; $p<0,001$) је успешних од неуспешних покушаја детерминације пола ако се посматрају сви узорци, као и ако се посматрају узорци по врстама ($\chi^2=50,904$; $p<0,001$).

5.1. Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из различитих типова ткива птица

Процент успешних изолација ДНК кретао се од 25% када се као узорак користио фецес, до 100% када су у питању анализе где су коришћени брис усне душље и узорци ткива из формалина (Табела 1). Резултат χ^2 - теста ($\chi^2=104,596$; $p<0,001$) указује да успешност изолације ДНК врло значајно зависи од начина изолације, односно врсте узорка који се користи као извор ДНК.

Табела 1. Распоред различитих типова ткива према успешности изолације ДНК

Начин изолације		Резултат изолације		Укупно
		Успешно	Неуспешно	
Перје	Број	424	36	460
	%	92,17	7,83	100,00
Крв	Број	14	1	15
	%	93,33	6,67	100,00
Брис усне душље	Број	29	0	29
	%	100,00	0,00	100,00
Фецес	Број	5	15	20
	%	25,00	75,00	100,00
FFPET*	Број	15	0	15
	%	100,00	0,00	100,00

**Formalin fixed, paraffin-embedded tissue* - узорци ткива из формалина

Успешност изолације ДНК из узорака фецеса у односу на успешност изолације из осталих типова ткива статистички је врло значајно ($p<0,001$) мања (Табела 2), док се успешност осталих начина изолације статистички не разликује значајно ($p>0,231$).

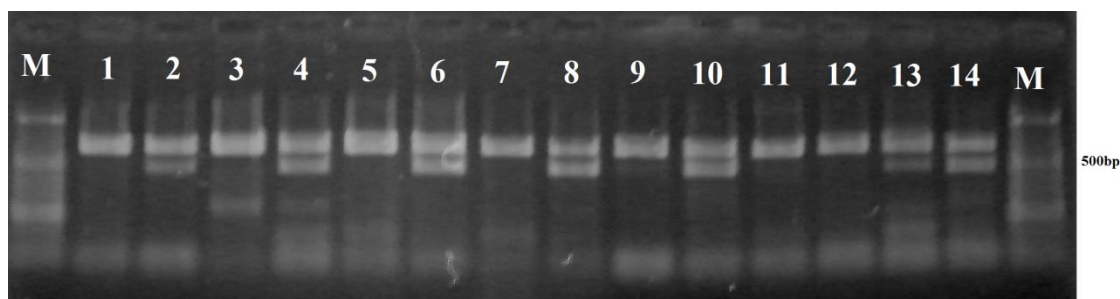
Табела 2. Нивои значајности (p) разлика успешности изолације ДНК из различитих типова ткива

Начин изолације	Крв	Брис усне дупље	Фецес	FFPET
Перје	0,746	0,231	<0,001	0,528
Крв		0,734	<0,001	0,500
Брис усне дупље			<0,001	1,000
Фецес				<0,001

*Напомена: С обзиром на величину узорака и појаву вредности нула међу фреквенцијама, означени резултати су добијени на бази теста тачне вероватноће, а остали на бази χ^2 -теста

5.1.1. Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из перја

Перје је као узорак, из ког је изолована ДНК, коришћено у укупно 460 анализа. Пол је успешно одређен у 380 анализа, у 44 анализа је добијен продукт амплификације али се пол није могао недвосмислено одредити, док у 36 анализа није добијен продукт PCR реакције (Слика 1).



Слика 1. Приказ добијених резултата одређивања пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; М - Ladder, 1 - *Ara ararauna* (♂), 2 - *A. ararauna* (♀), 3 - *Psittacus erithacus* (♂), 4 - *P. erithacus* (♀), 5 - *A. chloroptera* (♂), 6 - *A. chloroptera* (♀), 7 - *Amazona aestiva* (♂), 8 - *A. aestiva* (♀), 9 - *A. ochrocephala* (♂), 10 - *A. ochrocephala* (♀), 11 - *A. amazonica* (♂), 12 - *Nymphicus hollandicus* (♂), 13 - *A. amazonica* (♀), 14 - *N. hollandicus* (♀)

Перје је коришћено код свих испитиваних врста осим код врста *Eolophus roseicapilla* и *Meleagris gallopavo* (Прилог 1). Успешно одређивање пола је постигнуто код 79 испитиваних врста (Табела 3), док код врста

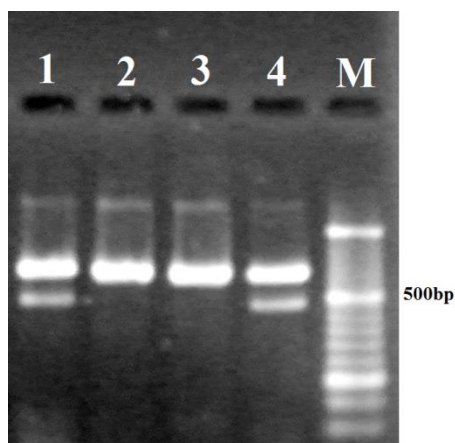
Melopsittacus undulatus (из 2 узорка) и *Tauraco persa* (из 3 узорка) нису добијени продукти амплификације. Код 9 врста (*Anser indicus*, *Branta canadensis*, *B. sandvicensis*, *Bubo bubo*, *Casuarus casuarus*, *Dromaius novaehollandiae*, *Eudocimus ruber*, *Ramphastos tucanus*, *Rhea americana*) није било могуће одредити пол иако је добијен амплификовани продукт.

Табела 3. Списак редова птица од којих је узорковано перје за анализу пола, број узорака, успешних и неуспешних анализа

Перје				
Ред	Успело	Неуспело	Недетерминисано	Укупно
Anseriformes	51	6	14	71
Ciconiiformes	9	3	3	15
Falconiformes	34	4	0	38
Coraciiformes	10	0	0	10
Casuariiformes	0	0	12	12
Columbiformes	7	1	0	8
Psittaciformes	222	18	0	240
Strigiformes	4	0	4	8
Passeriformes	10	1	0	11
Gruiformes	2	0	0	2
Cuculiformes	2	3	0	5
Piciformes	0	0	11	11
Galliformes	27	0	0	27
Podicipediformes	1	0	0	1
Charadriiformes	1	0	0	1
Укупно	380	36	44	460

5.1.2. Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из крви

Одређивање пола птица коришћењем крви као узорка за изолацију ДНК обављено је на 15 узорака, од 5 врста птица (*Amazona aestiva*, *Ara ararauna*, *Aratinga acuticaudata*, *Nymphicus hollandicus*, *Psittacus erithacus*).



Слика 2. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; 1 - *Ara ararauna* (♀), 2 - *A. ararauna* (♂), 3 - *A. ararauna* (♂), 4 - *A. ararauna* (♀), М - Ladder

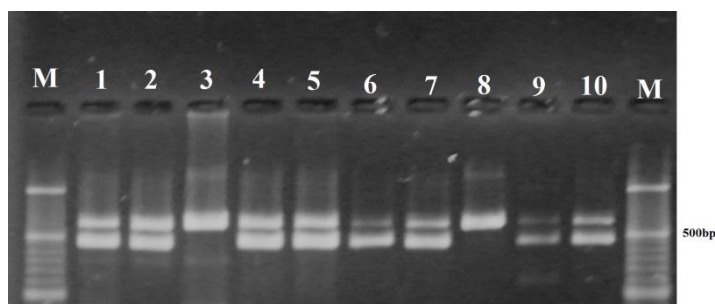
Пол је успешно одређен код свих 5 испитиваних врста птица у 14 анализа, док у једној анализи није добијен амплификовани продукт (Слика 2, Табела 4).

Табела 4. Списак врста птица од којих је узоркована крв за анализу пола, број узорака, успешних и неуспешних анализа

Крв					
Ред	Врста	Успело	Неуспело	Недетерминисано	Укупно
Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	2	0	0	2
	<i>Psittacus erithacus</i>	2	0	0	2
	<i>Ara ararauna</i>	1	0	0	1
	<i>Aratinga acuticaudata</i>	1	1	0	2
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	8	0	0	8
Укупно		14	1	0	15

5.1.3. Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из бриса усне дупље

Анализирано је 29 узорака бриса усне дупље од птица из 11 врста (*Ara ararauna*, *A. chloroptera*, *A. severa*, *Cacatua galerita*, *Eolophus roseicapilla*, *Gallus gallus*, *Gyps fulvus*, *Neophron percnopterus*, *Podiceps cristatus*, *Psittacus erithacus*, *Tyto alba*) (Табела 5). Пол је успешно одређен код свих врста код којих је брис усне дупље коришћен као извор ДНК (Слика 3).



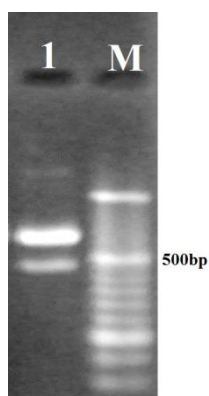
Слика 3. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; М - Ladder, 1 - *Gallus gallus* (♀), 2 - *G. gallus* (♀), 3 - *G. gallus* (♂), 4 - *G. gallus* (♀), 5 - *G. gallus* (♀), 6 - *G. gallus* (♀), 7 - *G. gallus* (♀), 8 - *G. gallus* (♂), 9 - *G. gallus* (♀), 10 - *G. gallus* (♀), М - Ladder

Табела 5. Списак птица од којих је узоркован брис усне дупље за анализу пола, број узорака, успешних и неуспешних анализа

Брис усне дупље					
Ред	Врста	Успело	Неуспело	Недетерминисано	Укупно
Falconiformes	<i>Neophron percnopterus</i>	1	0	0	1
	<i>Gyps fulvus</i>	3	11	0	14
Psittaciformes	<i>Psittacus erithacus</i>	3	0	0	3
	<i>Ara ararauna</i>	3	0	0	3
	<i>Ara chloroptera</i>	4	0	0	4
	<i>Cacatua galerita</i>	1	0	0	1
	<i>Ara severa</i>	1	0	0	1
	<i>Eolophus roseicapilla</i>	4	0	0	4
Strigiformes	<i>Tyto alba</i>	3	0	0	3
Galliformes	<i>Gallus gallus</i>	5	0	0	5
Podicipediformes	<i>Podiceps cristatus</i>	1	0	0	1
Укупно		29	11	0	40

5.1.4. Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из фецеса

За одређивање пола код 4 врсте птица (*Ara ararauna*, *A. chloroptera*, *Psittacus erithacus*, *Serinus canaria*) као узорак за изолацију нуклеинских киселина је коришћен фецес (Табела 6). Одређивање пола је покушано у 20 анализа. Анализе су биле успешне код све 4 врсте (Слика 4). Међутим, од 20 анализа успешно је било свега пет. У осталих 15 анализа није добијен амплификовани продукт.



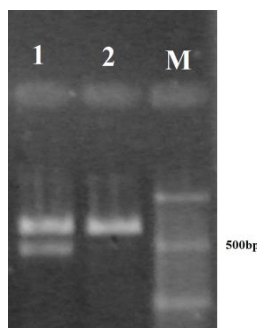
Слика 4. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; 1 – *Ara ararauna* (♀), М – Ladder

Табела 6. Списак врста птица од којих је узоркован фецес за анализу пола, број узорака, успешних и неуспешних анализа

Фецес					
Ред	Врста	Успело	Неуспело	Недетерминисано	Укупно
Psittaciformes	<i>Psittacus erithacus</i>	1	5	0	6
	<i>Ara ararauna</i>	1	1	0	2
	<i>Ara chloroptera</i>	1	1	0	2
Passeriformes	<i>Serinus canaria</i>	2	8	0	10
Укупно		5	15	0	20

5.1.5. Успешност изолације ДНК и амплификације CHD гена из ткивних формалинских исечака

Ткивни формалински исечци различитих ткива птица су коришћени за одређивање пола код укупно 15 јединки, представника 6 врста птица (*Ara ararauna*, *Anser anser*, *Columba livia*, *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Perdix perdix*) (Табела 7). Пол је успешно одређен код свих испитиваних узорака (Слика 5).



Слика 5. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; 1 – *Ara ararauna* (♀), 2 – *Columba livia* (♂), М - Ladder

Табела 7. Списак врста птица од којих су узорковани ткивни формалински исечци различитих ткива птица за анализу пола, број узорака, успешних и неуспешних анализа

Ткивни формалински исечци					
Ред	Врста	Успело	Неуспело	Недетерминисано	Укупно
Anseriformes	<i>Anser anser</i>	1	0	0	1
Columbiformes	<i>Columba livia</i>	1	0	0	1
Psittaciformes	<i>Ara ararauna</i>	1	0	0	1
Galliformes	<i>Perdix perdix</i>	1	0	0	1
	<i>Gallus gallus</i>	10	0	0	10
	<i>Meleagris gallopavo</i>	1	0	0	1
Укупно		15	0	0	15

5.2. Успешност амплификације CHD гена применом различитих протокола

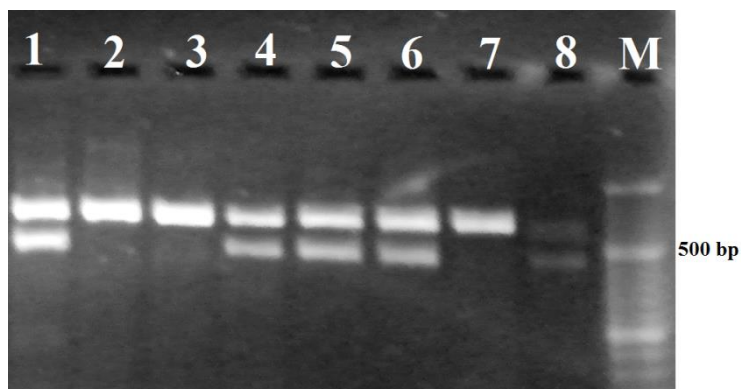
За амплификацију CHD гена коришћена су два протокола која се статистички врло значајно разликују по успешности ($\chi^2=34,550$; $p<0,001$). Протокол који је подразумевао примену модификоване *Taq* ДНК полимеразе (КАРА2G Robust DNA Polymerase) дизајниране да буде отпорна на инхибиторе PCR био је успешнији у 19,87% случајева од протокола са обичном *Taq* ДНК полимеразом (Табела 8).

Табела 8. Резултати протокола за амплификацију CHD гена

Протокол		Резултат протокола		Укупно
		Успео	Није успео	
<i>Taq</i> ДНК полимераза	Број	147	68	215
	%	68,37	31,63	100,00
Модификована <i>Taq</i> ДНК полимераза	Број	345	46	391
	%	88,24	11,76	100,00

5.2.1. Успешност амплификације CHD гена применом *Taq* ДНК полимеразе

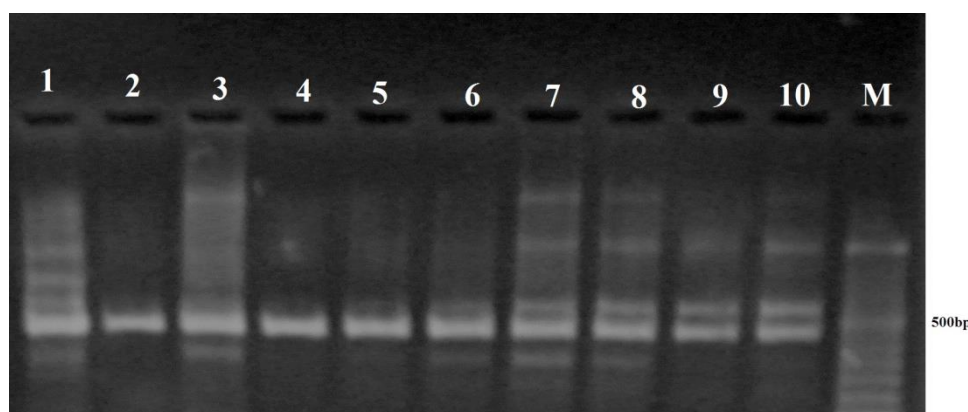
Одређивање пола применом *Taq* ДНК полимеразе покушано је у укупно 215 анализа, код узорака (перје и крв) пореклом од 41 врсте птица (Прилог 2). Продукт PCR реакције је добијен у укупно 147 реакција, док у 68 реакција није добијен амплификовани производ (Табела 9; Слика 6).



Слика 6. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду;

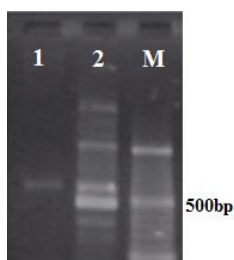
1 - *Nymphicus hollandicus* (♀), 2 - *N. hollandicus* (♂), 3 - *N. hollandicus* (♂), 4 - *N. hollandicus* (♀), 5 - *N. hollandicus* (♀), 6 - *N. hollandicus* (♀), 7 - *N. hollandicus* (♂),
 М - Ladder

Градијентни PCR је примењен код појединих узорака, код којих добијени амплификати нису били јасно видљиви или код којих је било доста неспецифичних продуката који су онемогућавали недвосмислено одређивање пола. Мењана је температура хибридизације (у опсегу 50.5° C, 51.1° C, 52.4° C, 53.9° C, 55.3° C, 56° C, 57.3° C, 58.4° C, 59.4° C, 59.7° C). На температури од 51.1° C код два узорка пореклом од врсте *Alorochen aegyptiacus* добијени су амплификати који су се могли визуелизовати, док су неспецифичне траке биле одсутне (Слика 7).



Слика 7. Амплификација узорка пореклом од врсте *Alorochen aegyptiacus* коришћењем градијентног PCR-а, 1 - 59.7° C, 2 - 59.4° C, 3 - 58.4° C, 4 - 57.3° C, 5 - 56° C, 6 - 55.3° C, 7 - 53.9° C, 8 - 52.4° C, 9 - 51.1° C, 10 - 50.5° C, М - Ladder

Код једног од та два узорка пореклом од врсте *Alopochen aegyptiacus* одређен је женски пол, док код је код другог узорка добијена трака била слабо видљива те се приступило реамплификацији добијених PCR продуката. Након реамплификације, могле су се визуелизовати две траке код узорка пореклом од женке и једна трака код узорка пореклом од мужјака (Слика 8), чиме је дефинитивно потврђено да је на температури хибридизације од 51.1° С амплификован CHD-W ген а не да се визуелизовао неспецифичан продукт PCR реакције.



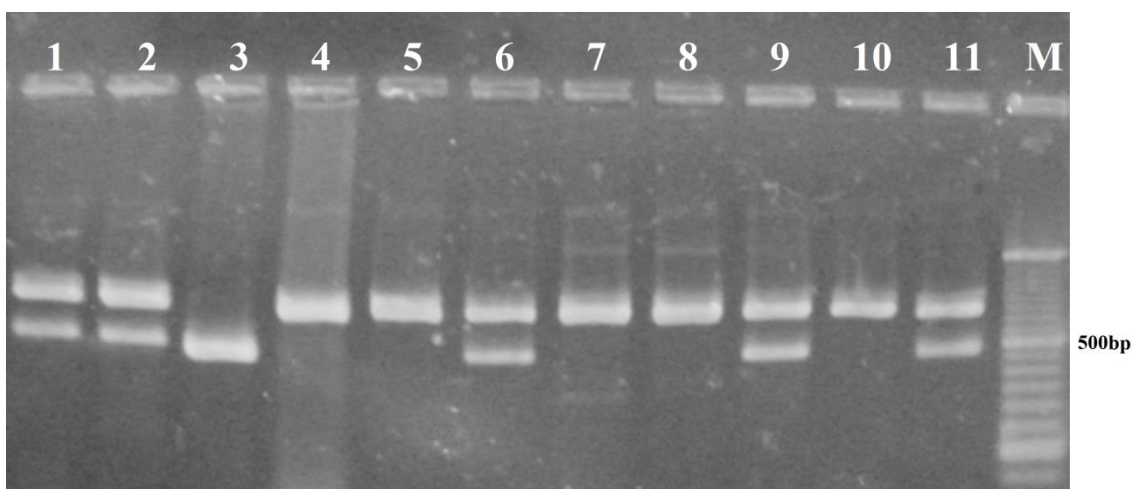
Слика 8. Реамплификација узорка пореклом од врсте *Alopochen aegyptiacus*;
1 - *A. aegyptiacus* (51.1° С) (♂), 2 - *A. aegyptiacus* (51.1° С) (♀)

Табела 9. Списак редова птица код којих је за анализу пола коришћена *Taq* ДНК полимераса, број узорка, успешних и неуспешних анализа

Протокол 1				
Ред	Успело	Неуспело	Недетерминисано	Укупно
Anseriformes	27	14	10	51
Ciconiiformes	9	4	3	16
Falconiformes	12	1	0	13
Coraciiformes	5	1	0	6
Casuariiformes	0	4	8	12
Columbiformes	4	0	0	4
Psittaciformes	62	35	0	97
Strigiformes	0	3	0	3
Passeriformes	4	3	0	7
Gruiformes	2	1	0	3
Cuculiformes	0	2	0	2
Piciformes	0	0	1	1
Укупно	125	68	22	215

5.2.2. Успешност амплификације CHD гена применом модификоване *Taq* ДНК полимеразе (КАРА2G Robust DNA Polymerase) дизајниране да буде отпорна на инхибиторе PCR

Одређивање пола применом модификоване *Taq* ДНК полимеразе дизајниране да буде отпорна на инхибиторе PCR покушано је у укупно 418 анализа (Прилог 3), код узорака (перје, крв, брис усне дупље и фецес) пореклом од 64 врсте птица (Слика 9).



Слика 9. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; 1 - *Ara severa* (♀), 2 - *A. severa* (♀), 3 - *Cygnus atratus* (♀), 4 - *Aratinga solstitialis* (♂), 5 - *A. solstitialis* (♂), 6 - *A. solstitialis* (♀), 7 - *Pyrrhura conura* (♂), 8 - *P. conura* (♂), 9 - *Psittacus erithacus* (♀), 10 - *P. erithacus* (♂), 11 - *A. chloroptera* (♀), M - Ladder

Продукти PCR реакције су добијени у укупно 344 реакција, док у 74 реакција није добијен амплификовани производ (Табела 10).

Табела 10. Списак редова птица код којих је за анализу пола коришћена модификована *Taq* ДНК полимеразе дизајнирана да буде отпорна на инхибиторе

PCR

Протокол 2				
Ред	Успело	Неуспело	Недетерминисано	Укупно
Anseriformes	28	4	0	32
Ciconiiformes	2	0	0	2
Falconiformes	24	30	0	54
Coraciiformes	4	0	0	4
Columbiformes	6	1	0	7
Psittaciformes	222	34	0	256
Strigiformes	7	0	2	9
Passeriformes	6	1	0	7
Cuculiformes	3	1	0	4
Piciformes	0	2	10	12
Galliformes	29	1	0	30
Podicipediformes	1	0	0	1
Charadriiformes	1	0	0	1
Укупно	332	74	12	418

6. ДИСКУСИЈА

Комплетно разумевање биологије било које врсте са полним размножавањем зависи од способности да се разликују мужјаци и женке. То је пре свега зато што пол најчешће проузрокује највећу појединачну поделу унутар врсте и то за последицу има разлике у физиологији, понашању и екологији припадника исте врсте (Griffiths и Tiwari, 1993).

Код више од 50% врста птица мужјаци и женке се не могу разликовати по некој споља видљивој карактеристици и те врсте се означавају као мономорфне. Са друге стране и код диморфних врста код којих наизглед постоји јасна разлика у фенотипу мужјака и женки, она се испољава тек након достизања полне зрелости, што значи да се не могу разликовати полови њихових младунаца, зато што је потребно доста времена да се испоље различитости код птића (Griffiths и Tiwari 1995, Griffiths и сар, 1998).

Прве методе које су се користиле за одређивање пола код птица заснивале су се на поређењу различитих морфолошких структура или на анализирању појединих образаца понашања. Након тога су се примењивали ултразвук, хирушки и цитолошки методи, док је прекретницу у овом пољу представљало откриће PCR технике којом се откривају разлике на нивоу молекула ДНК. Молекуларно генетичке анализе се сматрају најадекватнијим за одређивање пола код птица због високе поузданости, брзине извођења и економичности (Cerit и Avanus, 2007 R).

Значај дефинисања протокола који би се могао користити за одређивање пола код већине врста птица је вишеструк. Анализе имају две основне примене – при проучавању односа полова унутар популација и друго, при менаџменту програма очувања угрожених врста птица (Griffiths и сар., 1996). Анализе пола птица су веома корисне у свим еколошким проучавањима, проучавањима понашања, формирању парова, програмима очувања угрожених врста, менаџменту популација дивљих врста птица, анализама стратегија гајења у комерцијалном живинарству, еволуционим проучавањима и у форензици (Morinha и сар., 2012).

Полно везани гени тренутно представљају најзначајније кандидате за дефинисање универзалног молекуларног маркера за одређивање пола птица између осталог јер структуре које су одговорне за то да ли ће се ембрион развити у мужјака или у женку још увек нису откривене. Међу бројним таквим генима, CHD ген је током последње деценије испољио највећи потенцијал да се може користити као универзални маркер за одређивање пола. Због великог значаја који анализе одређивања пола птица имају у бројним пољима истраживања, неопходно је пронаћи метод који ће бити поуздан, једноставан за примену, економичан, брз за извођење и да се при томе јединкама којима се одређује пол не нарушава физички и психички интегритет, нити да се угрожава безбедност особе која врши анализе.

6.1. Поређење успешности изолације ДНК из различитих ткива птица

Крв представља изузетно богат извор ДНК услед присуства једра у еритроцитима (Harvey и сар., 2006) и до скоро је представљала тип узорка који се најчешће користио у анализама пола птица. У протеклих 20 година приметан је константан развој молекуларно генетичких метода те је данас могуће изоловати ДНК не само из крви, која се сматра традиционалним

узорком за испитивања, већ и из различитих узорака ткива птица (Gaunt и сар., 1999). Два основна параметра која утичу на избор ткива које ће се користити као узорак јесу степен нелагодности који се изазива код птице приликом узорковања и друго, колики је степен успешности анализа након коришћења одређеног типа узорка. Као извори ДНК углавном се користе крв (Bush и сар., 2005), перје (Ong и Vellayan, 2008), брис усне дупље (Seki, 2003), формалински исечци различитих ткива (Bonin и сар., 2010), фецес (Marrero и сар., 2009) и друга ткива (An и сар., 2007). У складу са овим радовима и ми смо у нашем раду за изолацију ДНК користили перје, крв, брис усне дупље, фецес и формалинске исечке различитих ткива птица.

Два основна проблема која постоје при коришћењу перја јесу недовољна количина ДНК која се добија након изолације и друго, лош квалитет ДНК (McDonald и Griffith, 2011). Успешност анализа аутора који су користили перје за молекуларно генетичка испитивања кретала се углавном од 50 до 60% (Segelbacher и сар., 2002; Веја-Переира и сар., 2009), док се са појавом квалитетнијих хемикалија проценат успешности повећао на 71% (Maurer и сар., 2010), па чак и до 91% (McDonald и Griffith, 2011). Поједини аутори су објавили да им је за већу успешност анализа био потребан већи број циклуса PCR реакције него што је то случај када су користили крв као извор ДНК (Sacchi и сар., 2004; Harvey и сар., 2006). У нашем раду постигнута је успешност од 92,17% када је перје коришћено за изолацију ДНК и то без модификације PCR протокола у односу на онај који је коришћен при раду са осталим типовима узорака. С обзиром на литературне податке, разлика у успешности може бити последица узорковања искључиво чистог и неоштећеног перја, пажљивијег руковања са перјем током и након узорковања и коришћења хемикалија које су толерантније на присуство различитих инхибитора PCR реакције.

Количина и квалитет ДНК изоловане из крви су углавном високи. Аутори који су испитивали успешност коришћења крви објављивали су углавном врло високу успешност – од 98% (Wellbrock и сар., 2012) до 100% (Jensen и сар., 2003; Bush и сар., 2005; Handel и сар., 2006). Међутим, оно што је заједничко за те радове јесу коришћење специјалних хемикалија за концентровање ДНК и неутралисање евентуалних инхибитора или изузетно дуга времена инкубације са протеиназом К – и до 16 часова (Seki, 2003). Успешност анализа у нашем раду је нижа од литературне и износи 93,33%. Разлог нешто нижем проценту успешности вероватно је у чињеници што су коришћени комерцијални китови за изолацију ДНК који у себи не садрже хемикалије које неутралишу инхибиторе а и читав поступак изолације је трајао краће, непуних 30 минута.

Све до почетка овог века, код птица се брис усне дупље није користио као извор ДНК за молекуларно генетичка истраживања. Захваљујући интензивнијем раду са угроженим и заштићеним врстама птица којима се не сме нарушававати физички интегритет узорковањем крви или перја, започело се са коришћењем бриса усне дупље. Врло брзо, коришћење бриса усне дупље као извора ДНК се показало доста успешним (Seki, 2003). У литератури се могу наћи различити подаци о успешности коришћења бриса усне дупље као извора ДНК. Тако Arima и Onishi (2006) публикују успешност од 82% анализа, док Seki (2003) у свом раду наводи успешност од 100%. У нашем раду успешност анализа је била идентична – 100%.

Узорковање фецеса представља потпуно неинвазиван метод, с обзиром на одсуство контакта са птицом током узимања узорка. Успешност анализа у литератури је различита. Заједничко за све јесте да је успешност ниска када се примењују протоколи који се користе и за изолацију ДНК из других типова ткива и креће се од 15% (Seki, 2003) до 25% (Вошњак и сар., 2013). Када се примењују протоколи који подразумевају употребу хемикалија за неутралисање наведених инхибитора (попут оних који се примењују у форензичке сврхе) али

подразумевају и инкубирање узорака у трајању од неколико часова, може се постићи успешност од 65% (Yamauchi и сар., 2000). У нашем раду, у коме су примењене идентичне хемикалије за изолацију ДНК из свих типова узорака, успешност анализа при коришћењу фецеса била је 25%. Присуство инхибитора PCR реакције у фецесу, као што су пигменти (Baignet и сар., 2005), мртве ћелије, РНК (Nielsen и сар., 2000), различити микроорганизми, састојци биљака у храни хербивора (Robertson и сар., 1999) или комплексни полисахариди (Monteiro и сар., 1997) које је тешко уклонити стандардним методама изолације нуклеинских киселина (Seki, 2003) у многоме угрожава извођење анализа. Да би се постигао виши степен успешности анализа уз коришћење фецеса, неопходно је користити додатне хемикалије за изолацију ДНК које ће неутралисати контаминенте (превасходно инхибиторне материје биљног порекла) те је примена фецеса као узорка врло незахвална јер се повећавају трајање и цена анализе (Robertson и сар., 1999).

Коришћење формалинских исечака различитих ткива птица као извора ДНК најпогодније је када су у питању форензичке анализе које су све чешће у ветеринарској медицини. Такође, овакав начин изоловања ДНК је незаменљив када се ради са архивским узорцима. Један од проблема који се може појавити јесте да је парафин у ком се ткиво чува инхибитор PCR реакције. Међутим, савремени сетови за изолацију нуклеинских киселина углавном без већих проблема савлађују сличне препреке (Bravo и сар., 2007). У литератури се могу пронаћи радови у којима се успешност изолације креће и до 100% (Sato и сар., 2001; Shi и сар., 2004), као што су и у нашем раду биле успешне све анализе у којима је коришћен овај тип узорка.

6.2. Поређење успешности различитих протокола за амплификацију CHD гена

У узорцима који се користе за изолацију ДНК оправдано је очекивати присуство бројних инхибитора PCR реакције као што су пигменти, мртве ћелије, РНК, различити микроорганизми, састојци биљака у храни хербивора или комплексни полисахариди. CHD ген је високо конзервисан између птица и сисара (Elegren и Sheldon, 1997) и уколико је у узорку присутан и страни генетички материјал при PCR амплификацији може доћи до преференцијалне амплификације фрагмената CHD гена контаминирајуће ДНК. Контаминација може водити ка настанку PCR продуката који се након електрофорезе виде као једна трака на гелу, исто као у случају детерминације мушког пола код птица (Elegren и Sheldon, 1997). Мала количина иницијалне ДНК повећава утицај контаминације, па је ДНК изолована из пера подложнија овим проблемима (Duan и Fuerst, 2001). Услед мале количине иницијалне ДНК може се догодити да један алел остане недетектован. Уколико је то W алел, женке се могу погрешно идентификовати као мужјаци. Осим тога, мала количина ДНК може проузроковати појаву неспецифичних позадинских трака на гелу које често компликују интерпретацију резултата па је потребно резултате проверавати додатним циклусима амплификације (Arima и Onishi, 2006) или паралелном употребом два сета прајмера (Brady и сар., 2009). Модификована *Taq* ДНК полимеразе (КАРА2G Robust ДНК полимеразе) је специјално дизајнирана полимеразе која обезбеђује већу процесивност и виши ниво толеранције на уобичајене PCR инхибиторе него wild-type *Taq* полимеразе. Применом ове полимеразе остварени су добри резултати са узорцима код којих са обичном полимеразом није могао да се одреди пол. Такође, постигнут је и успех код врста код којих су други аутори били неуспешни а који су при томе користили идентичан сет прајмера (Wang и сар., 2007). У нашем раду при коришћењу wild-type *Taq* ДНК полимеразе,

која нема отпорност ка инхибиторима PCR реакције, добијени су незадовољавајући резултати и показала се потреба за модификацијама основног протокола у виду промене температуре хибридизације или обављања реамплификације код узорака пореклом од појединих врста птица. Примена модификоване *Taq* ДНК полимеразе, омогућила је већу успешност анализа.

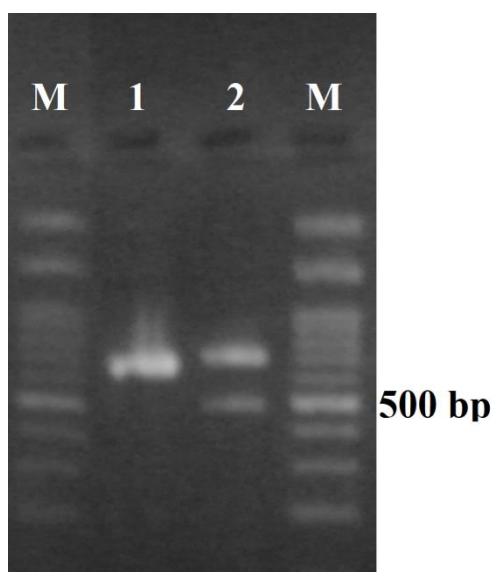
6.3. Процена универзалности CHD гена као молекуларног маркера за детерминацију пола птица

Имајући у виду да је циљ рада био испитивање универзалности CHD гена као молекуларног маркера за одређивање пола птица, биолошки материјал је узоркован од 83 врсте, из 15 редова, које су филогенетски удаљене једне од других, како би се добио репрезентативан узорак.

Један од основних проблема који се може јавити при тумачењу резултата након амплификације CHD гена јесте недовољна разлика у величини добијених продуката PCR реакције. При коришћењу појединих сетова прајмера, попут P2/P8, разлика у величини добијених амплификата је врло мала те се две траке могу видети као једна, а самим тим се и женке грешком могу прогласити мужјацима (Ong и Vellayan, 2008). Код појединих врста птица (*Ara ambiguus*, *A. ararauna*, *A. cyanoptera*, *A. macao*, *Branta sandvicensis*, *Caloenas nicobarica*, *Coracias indicus*, *Dendrocygna viduata*, *Eclectus roratus roratus* и *Psittacula cyanocephala*) разлика у величини амплификованих продуката није велика и креће се у опсегу од 10 до 80 bp али је најчешће 30 до 50 bp (Jensen и сар., 2003). Због такве разлике у величини трака није једноставно недвосмислено одредити да ли се на агарозном гелу налазе две или једна трака те је неопходно коришћење прецизнијих метода попут електрофорезе са акриламидним геловима (Garcia и сар., 2008) или капиларне електрофорезе (Lee и сар., 2010). Развој и примена високорезолутних техника вероватно би омогућили добијање јаснијих резултата али би се поставило питање економске оправданости

таквих анализа. За овакве случајеве могуће је користити рестрикционе ензиме ако у добијеним амплификатима CHD-W и CHD-Z гена постоје различита рестрикциона места, чиме би се откриле њихове разлике и омогућило одређивање пола (Griffiths и сар., 1996; Sacchia и сар., 2004). Могуће је користити и мултиплекс PCR (са прајмерима P0, P2, P8) који је примењен код врста из редова Anseriformes, Galliformes, Ciconiiformes, Falconiformes, Charadriiformes, Psittaciformes, Strigiformes, Caprimulgiformes, Piciformes, Passeriformes, Sphenisciformes и Struthioniformes (Han и сар., 2009a), али то додатно компликује и покушљује анализе а код јединки већине редова и применом прајмера коришћених у овом раду пол се могао успешно одредити. У нашем раду, примена 2550F/2718R сета прајмера омогућила је детерминацију пола код 74 врсте птица, између осталог и код врста код којих до сада није било успешно извршено одређивање пола применом других сетова прајмера (*Alopochen aegyptiacus*, *Amazona finschi*, *Anser anser*, *A. fabalis*, *Ara severus*, *Aratinga acuticaudata*, *A. aurea*, *Barnardius zonarius*, *Bucorvus leadbeateri*, *Buteo buteo*, *Cereopsis novaehollandiae*, *Columba arquatrix*, *Coracopsis nigra*, *Corvus corax*, *C. frugilegus*, *Coturnix coturnix*, *Cyanoliseus patagonus*, *Guttera plumifera*, *Lamprotornis superbus*, *Milvus milvus*, *Neophron percnopterus*, *Ocyphaps lophotes*, *Perdix perdix*, *Podiceps cristatus*, *Poicephalus senegalus*, *Scolopax rusticola*). Добијени амплификати CHDZ и CHDW гена су се разликовали у величини од 150 до 250 bp и управо та разлика у величини амплификата омогућује недвосмислено тумачење резултата на агарозном гелу, што није случај када се примењују други сетови прајмера. Самим тим, одређивање пола се завршава након PCR реакције без потребе за даљим усложњавањем и покушљивањем анализа. Прајмери 2550F/2718R се везују за високо конзервисани егзонски део CHD гена и умножавају варијабилну интронску секвенцу захваљујући чему и постоји разлика у амплификованим производима код мужјака и женки.

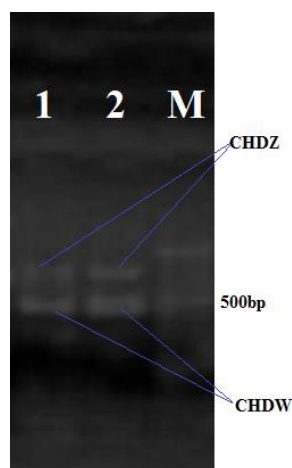
Услед мале разлике у величини амплификованих продуката који настају применом других сетова прајмера код врста из рода *Ciconia* поједини аутори су се опредељивали за примену комплекснијих молекуларних метода, попут PCR-RFLP и секвенционирања (Нап и сар., 2009b). У нашем раду, амплификација је извршена прајмерима 2550F/2718R, а разлика у величини продуката који су се добили је била довољна да се они јасно раздвоје на агарозном гелу (Слика 10).



Слика 9. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; М - Ladder, 1 - *Ciconia ciconia* (♂), 2 - *C. ciconia* (♀), М - Ladder

Разлика у величини амплификованих продуката применом прајмера P2/NP код представника фамилије Falconidae износи 20 bp, док је код појединих представника фамилије Accipitridae још мања - свега 2-8 bp (Ito и сар., 2003). Nesje и Røed (2000) су амплификовали CHDZ и CHDW гене (применом прајмера F: GCTTCGCCCCAAAACAAG и R: TGTTCAGTGGATGACTG; F: TTTGGTTGAGAAGTGAGTG и

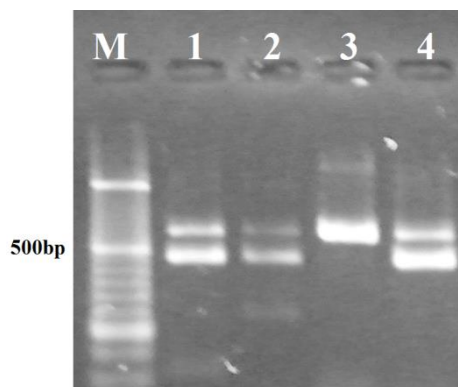
R: GTAAGCCAGAGAAAAATGC) код врсте *Falco subbuteo*, а разлика у величини добијених продуката је износила свега 1 базни пар и било је неопходно применити ARMS технику како би се одредио пол испитиваних јединки. Поредећи наше резултате, ми смо у нашем раду применом 2550F/2718R сета прајмера остварили разлику у величини амплификованих продуката од око 150 bp и потврдили да је боље користити наведени сет прајмера зато што је амплификате могуће без проблема раздвојити на агарозном гелу, а самим тим пол јединке одредити поузданије, брже и економичније (Слика 11).



Слика 11. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; 1 - *Haliaeetus albicilla* (♀), 2 - *H. Albicilla* (♂), M - Ladder

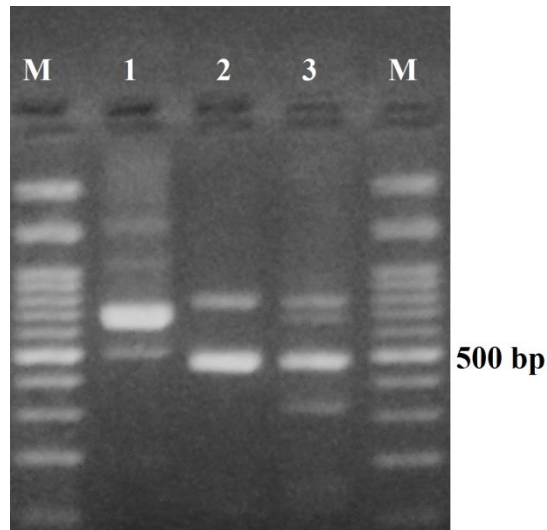
Naim и сар., (2011) су при анализи пола код врста *Haliaeetus leucogaster* и *Gallus gallus*, након амплификације прајмерима P2/P3 и P2/P8 утврдили да је било неопходно урадити и дигестију амплификата применом *HaeIII* рестрикционих ензима због сувише мале разлике у величини производа PCR реакције. Међутим, у нашем раду при анализи узорака врсте *Gallus gallus* и узорака врста из рода *Haliaeetus* применом 2550F/2718R сетом

прајмера, добијани су амплификати који се лако раздвајају на агарозном гелу те није било потребе користити рестрикционе ензиме с обзиром да се пол могао одредити одмах након PCR амплификације (Слика 12).



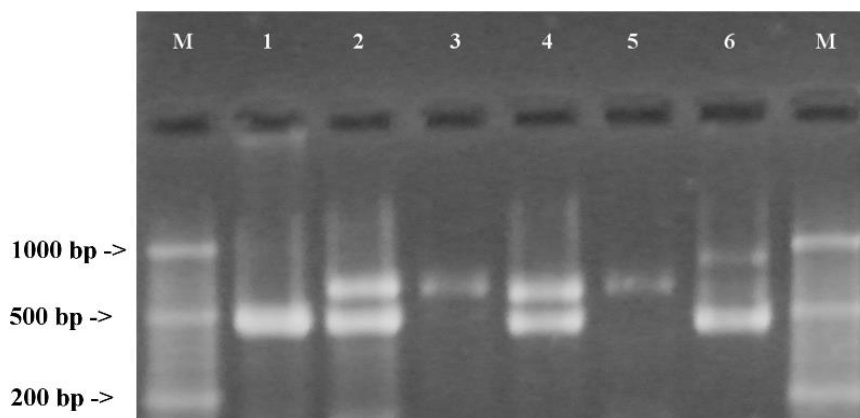
Слика 12. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; M – Ladder, 1 – *Gallus gallus* (♀), 2 – *G. gallus* (♀), 3 – *G. gallus* (♂), 4 – *G. gallus* (♀)

Ramos и сар. (2009) су за одређивање пола код јединки из рода *Accipiter* поред примене P2/P8 сета прајмера морали да користе и SSCP технику јер се добијени производи амплификације нису могли раздвојити на агарозном гелу како би се могао недвосмислено одредити пол. Само увођење додатног корака у многеме поскупљује и компликује метод. Код врло сродних врста, припадника исте фамилије, у нашем раду се без потешкоћа могао одредити пол применом 2550F/2718R сета прајмера с обзиром на постојање разлике од око 150 bp између амплификата (Слика 13).



Слика 13. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; М - Ladder, 1 - *Aquila heliaca* (♀), 2 - *Haliaeetus albicila* (♀), 3 - *H. albicila* (♀), М - Ladder

Lee и сар. су 2008. публиковали рад у ком примењују ARMS метод код великог броја врста птица. Иако се показао доста успешним, код врсте *Phasianus colchicus* и код јединки рода *Anatidea* није била могућа примена овог метода јер су се као производ реакције добијале две траке исте величине и њихово раздвајање на агарозном гелу није било могуће. Наши резултати за врсту *Phasianus colchicus* али и за врсте из рода *Anatidea* које су филогенетски блиске врстама које су испитивали Lee и сар. указују да је сасвим довољно амплификовати CHD ген по протоколу описаном у нашем раду јер се настали продукти, услед разлике у величини, јасно раздвајају електрофорезом на агарозном гелу. Самим тим и одређивање пола је могуће без примене додатних метода (Слика 14).

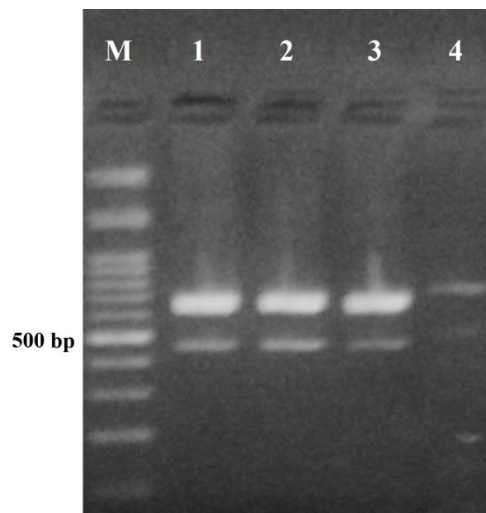


Слика 14. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; М - Ladder, 1 - *Anser anser* (♀), 2 - *Corvus frugilegus* (♀), 3 - *Perdix perdix* (♂), 4 - *Coturnix coturnix* (♀), 5 - *Scolopax rusticola* (♂), 6 - *Phasianus colchicus* (♀), М - Ladder

Одређивање пола код врсте *Coturnix japonica* раније је успешно изведено применом прајмера Соја-F и Соја-R (Vali и Doosti, 2011). Применом наведених прајмера код женки се амплификује једна трака док се код мужјака не добија продукт PCR амплификације. То је с једне стране добро, јер се јасно уочава разлика између полова, али са друге стране постоји ризик од проглашавања неуспелих реакција мужјацима. Код исте врсте Morinha и сар. (2011) су за детерминацију пола примењивали real time PCR, односно high-resolution melting (HRM). Коришћењем сета прајмера P2/P8 и специјалних боја добија се поуздан резултат за краће време. У нашем раду, код представника истог рода, применом 2550F/2718R сета прајмера избегнуто је добијање лажних резултата, цена анализе је доста нижа, а уз то је и извођење реакције једноставније (Слика 14).

Wang и сар. (2007) су испитивали могућност одређивања пола применом 2550F/2718R и 1237L/1272H сетова прајмера. Код одређеног броја врста птица није било успешно одређивање пола. Аутори су неуспех код птица тркачица приписали недостатку хетероморфизма на нивоу полних хромозома, док се узроком неуспеха код осталих врста птица (из

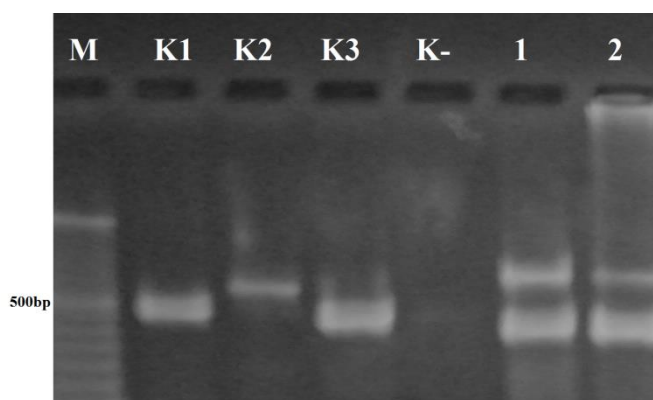
надреда летачица) превасходно сматрала нуклеотидна разноврсност на нивоу испитиваних сегмената гена. Међутим, код врста *Leptopilos crumeniferus*, *Phasianus colchicus*, *Nymphicus hollandicus* и *Amazona ochrocephala* у нашем раду пол је без потешкоћа одређен применом идентичног сета прајмера (2550F/2718R) (Слика 15). С обзиром на чињеницу да се у оба рада користи исти сет прајмера, неуспех анализа код наведених врста може се приписати лабораторијским поступцима, а не универзалности примене CHD гена.



Слика 15. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; М - Ladder, 1 - *Leptopilos crumeniferus* (♀), 2 - *L. crumeniferus* (♀), 3 - *L. crumeniferus* (♀), 4 - *Phasianus colchicus* (♀)

Wu и сар. (2006) су током једне обимне студије дизајнирали прајмере за одређивање пола код представника фамилије Columbidae. Новосинтетисани прајмери (TurSexOPAV17-F и TurSexOPAV17-R) су се показали врло ефикасним код свих испитиваних врста дате фамилије. Међутим, потенцијални проблем јесте што се пол одређује на основу амплификавања W-специфичне секвенце те се изостанак амплификата

може тумачити и као мужјак и као неуспешна PCR реакција. Такође, наведени прајмери су коришћени само код представника фамилије Columbidae па се не зна да ли се могу користити и код представника других фамилија и редова птица. У нашем раду амплификација CHD гена применом 2550F/2718R сета прајмера успешно је обављена код 4 врсте из реда Columbiformes (Слика 16), по протоколу који је био успешан и код још 70 врста птица.



Слика 16. Приказ добијених резултата детерминације пола различитих врста птица на агарозном гелу обојеном у етидијум бромиду; М - Ladder, K1 - Позитивна контрола, K2 - Позитивна контрола, K3 - Позитивна контрола, K- - негативна контрола, 1 - *Ocyphaps lophotes* (♀), 2 - *O. lophotes* (♀)

Дизајн 2550F/2718R сета прајмера је такав да је амплификовани W-фрагмент мањи, те је услед разлике у величини трака могућа детерминација пола јединке чак и када се само једна W трака визуелизује на гелу (Dawson и сар., 2001) уз обавезно коришћење позитивних контрола мужјака и женки исте врсте. Од узорака коришћених у овом раду, то је био случај код врста *Ajaia ajaja* и *Neophron percnopterus* а такви случајеви су претходно описани код неких представника редова Accipitridae, Anatidae, Falconidae, Gruidae и Scolopacidae (Fridolfsson и Ellergen, 1999). У нашем истраживању, величина највећег броја Z и W трака (као и разлика између

њих која се кретала од 150 до 250 bp) је била у опсегу који се могао очекивати на основу доступних литературних података (Fridolfsson и Ellegren, 1999). Величина Z трака је износила ~600bp, а W трака ~ 450bp.

Код врста код којих анализом CHD гена нисмо успели недвосмислено да одредимо пол (*Anser indicus*, *Branta sandvicensis*, *Bubo bubo*, *Casuaris casuaris*, *Dromaius novaehollandiae*, *Eudocimus ruber*, *Ramphastos cuvieri* и *Rhea americana*) на агарозном гелу се могла визуелизовати само једна трака код свих узорака. Неуспех у одређивању пола код птица тркачица у складу је са резултатима других аутора (Kahn и сар., 1998; Fridolfsson и Ellegren, 1999). Разлог за неуспешно одређивање пола код тркачица лежи у недостатку хетероморфних полних хромозома те није могуће амплификовати фрагменте који би били различите величине (Wang и сар., 2007). Код узорака врсте *Bubo bubo* добијене амплификоване продукте није било могуће раздвојити на агарозном гелу, што је у складу да налазима других аутора који су код већине сродних врста, из реда Strigiformes, добијали траке врло сличних величина (Griffiths и сар., 1998; Cerit и Avanus, 2007 R). Слично томе, код узорака пореклом од врсте *Ramphastos cuvieri* PCR продукти су били сувише сличне величине и нису се могли раздвојити на агарозном гелу, што су објавили и други аутори (Miyaki и сар., 1998). За преостале четири врсте (*Anser indicus*, *Branta canadensis*, *B. sandvicensis*, *Eudocimus ruber*) код којих нисмо одредили пол не постоје литературни подаци о молекуларно генетичким анализама пола те није било могуће вршити било какво поређење. Евентуалан узрок немогућности одређивања пола код наведене четири врсте може се тражити у недостатку или одсуству ДНК материјала који се анализира, контаминацији ДНК, присуству тешких метала у фоликулу пера, преференцијалној амплификацији краћег CHD-W гена, постојању полиморфизама на месту везивања прајмера, недовољној разлици у дужини умножених CHD-W и CHD-Z фрагмената или присуству генетичких аномалија. Одређивање пола применом молекуларно

генетичких метода такође може бити отежано услед интерспецијских (Kahn и сар. 1998) или интраспецијских (Lee и сар., 2010) варијација на нивоу интрона CHD гена или услед полиморфизма W хромозома (Dawson и сар., 2001).

Универзалност CHD гена као полно специфичног маркера базира се на разликама у величини амплификованих производа присутних код представника свих испитиваних редова (изузев птица тркачица). Такође, врло је битно напоменути да је та разлика у величини амплификованих продуката скоро идентична код свих редова који су у раду испитивани (Anseriformes, Charadriiformes, Ciconiiformes, Columbiformes, Coraciiformes, Cuculiformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Passeriformes, Podicipediformes, Psittaciformes и Strigiformes) што снажно сугерише да је нека значајна структурна мутација (попут делеције или инсерције) настала на нивоу интрона једне од две копије CHD гена током ране еволуције птица, пре раздвајања данас постојећих редова птица летачица (Fridolfsson и Ellegren, 1999).

Код врсте *Struthio camelus*, представника птица тркачица могуће је одредити пол применом мултиплекс PCR анализе која се заснива на амплификацији одређених сегмената CHD гена и примени прајмера специфичног само за W хромозом (Han и сар., 2009). Такав метод одређивања пола не може се сматрати универзалним али потврђује претпоставку да се CHD ген може користити као универзални молекуларни маркер.

Чињеница је да постоји изузетно висок степен конзервисаности чак и међу филогенетски врло удаљеним врстама птица и из тог разлога CHD ген представља интересантан маркер са потенцијалом за развијање универзалног протокола за молекуларну детерминацију пола птица. PCR амплификацијом CHD гена применом 2550F/2718R сета прајмера добијају се једна трака (Z) код мужјака и две траке (Z и W) код женки.

С обзиром да су птице код којих је детерминација пола успешно извршена и оне код којих није, широко распоређене на еволутивном стаблу, може се закључити да се неуспех у одређивању пола појединих врста у овом истраживању не може повезати са еволутивним односом између испитиваних врста птица.

7. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата и података из актуелне литературе, може се закључити следеће:

1. CHD ген се може користити као универзални молекуларни маркер за одређивање пола птица.
2. Перје се може сматрати узорком који је најбоље користити за молекуларно генетичке анализе пола код живих птица.
3. Много већа успешност се постиже у реакцијама где је коришћена полимераза специјално дизајнирана да буде отпорна на инхибиторе PCR реакције.
4. Испитивани пар прајмера 2550F/2718R се код свих птица летачица може користити за одређивање пола.

Протоколи коришћени у овом раду на репрезентативном узорку од 550 јединки пореклом од филогенетски врло удаљених врста птица су дали одличне резултате. Успешно одређивање пола код 74 врсте птица применом само једног сета прајмера и уз благе модификације PCR услова и термалног протокола наводи на закључак да се оваквим методолошким приступом може достићи универзални молекуларно генетички метод за одређивање пола код птица, односно, да се CHD ген може користити као универзални молекуларни маркер.

8. ПОПИС ЛИТЕРАТУРЕ

1. Abinawanto K., Shimada K., Yoshida K., Saito N., 1996, Effects of aromatase inhibitor on sex-differentiation and levels of p450(17-alpha) and p450(arom) messenger-ribonucleic-acid of gonads in chicken embryos, *Gen Comp Endocrinol*, 102, 241-246.
2. Adkins E.K., 1978, Sex Steroids and the Differentiation of Avian Reproductive Behavior, *Amer Zool*, 18, 3, 501-509.
3. Adkins E.K., Pniowski E.E., 1978, Control of reproductive behavior by sex steroids in male quail, *J Comp Physiol Psychol*, 92, 6, 1169-1178.
4. Agate R.J., Grisham W., Wade J., Mann S., Wingfield J., Schanen C., Palotie A., Arnold A.P., 2003, Neural not gonadal origin of brain sex differences in a gynandromorphic finch, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 4873-4878.
5. Alacs E.A., Georges A., FitzSimmons N.N., Robertson J., 2010, DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics, *Forensic Sci Med Pathol*, 6, 3, 180-194.
6. Alacs E.A., Georges A., 2008, Wildlife across our borders: a review of the illegal trade in Australia, *Aust J Forensic Sci*, 40:107-23.
7. 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.
8. Alonso-Alvarez C., 2006, Manipulation of Primary Sex-Ratio: an Updated Review, *Avian Poult Biol Rev*, 17, 1, 1 -20.
9. An J., Lee M., Min M., Lee M., Lee H., 2007, A molecular genetic approach for species identification of mammals and sex determination of birds in a forensic case of poaching from South Korea, *Forensic Sci Int*, 167, 59-61.
10. Anthony, L.L., Blumstein, D.T., 2000, Integrating behaviour into wildlife conservation: the multiple ways that behaviour can reduce N_e , *Biol Conserv*, 95, 303-315.
11. Archawaranon M., 1998, Hormonal Correlate of Seasonal Reproduction in Captive Thai Hill Mynahs, *Proc 22 Int Ornithol Congr Durban*, 69, 315-316.
12. Archawaranon M., 2002, Zoogeography of various Hill Mynah phenotypes in Thailand, *J Biol Sci*, 2, 645-647.

13. Archawaranon M., 2004, Rapid sexing hill mynah *Gracula religiosa* by sex chromosomes, *Biotechnology*, 3, 160-164.
14. Arima H., Ohnishi N., 2006, Usefulness of avian buccal cells for molecular sexing, *Ornithol Sci*, 5, 139-143.
15. Arlt D., Bensch S., Hansson B., Hasselquist D., Westerdahl H., 2004, Observation of a ZZW female in a natural population: implications for avian sex determination, *Proc R Soc Lond B*, 271, S249-S251.
16. Arnold A.P., 1997, Sexual differentiation of the zebra finch song system: positive evidence, negative evidence, null hypotheses, and a paradigm shift, *J Neurobiol*, 33, 572-584.
17. Arnold A.P., Chen X., 2009, What does the "four core genotypes" mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues?, *Front Neuroendocrinol*, 30, 1-9
18. Arnold K., Orr K., Griffiths R., 2003, Primary sex ratios in birds: problems with molecular sex identification of undeveloped eggs, *Mol Ecol*, 12, 3451-3458.
19. Arnold S.J., 1994, Bateman's principles and the measurement of sexual selection in plants and animals, *Am Nat*, 144, S126-S149.
20. Arnold A.P., Itoh Y., Melamed E., 2008, A bird's-eye view of sex chromosome dosage compensation, *Annu Rev Genom Hum G*, 9, 109-127.
21. 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.
22. Badyaev A.V., 2002, Growing apart: an ontogenetic perspective on the evolution of sexual size dimorphism, *Trends Ecol Evol*, 17, 369-378.
23. Baignet S., Petherbridge L., Howes K., Smith L., Currie R., Nair V., 2005, Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR, *J Virol Methods*, 123, 53-56.
24. Baker A.J., Piersma T., 1999, Molecular vs. phenotypic sexing in Red Knots, *Condor*, 101, 887-893.
25. Baldwin S.P., Oberholser H.C., Worley L.G., 1931, *Measurements Of Birds*, *Clevelandmuseum Of Natural History*, Cleveland, Ohio, 165.
26. Balthazart J., Ball G., 1995, Sexual differentiation of brain and behavior in birds, *Trends Endocrin Met*, 6, 1, 21-29.
27. 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.

28. Barrowclough G.F., Groth J.G., Odom K.J., Lai J.E., 2011, Phylogeography of the barred owl (*Strix varia*): species limits, multiple refugia, and range expansion, *Auk*, 128, 696–706.
29. Batellier F., Marchal F., Scheller M.F., Gautron J., Sellier N., Taouis M., Monbrun C., Vignal A., Brillard J.P., 2004, Sex ratios in mule duck embryos at various stages of incubation, *Theriogenology*, 61, 573–580.
30. Beja-Pereira A., Oliveira R., Alves P.C., Schwartz M.K., Luikart G., 2009, Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics, *Mol Ecol Res*, 9, 1279–1301.
31. Benito M., Gonzalez-Solis J., 2007, Sex ratio, sex-specific chick mortality and sexual size dimorphism in birds, *J Evolution Biol*, 20, 4, 1522–1530.
32. Bennet C.P., Docherty Z., Robb S.A., Ramani P., Hawkins J.R., Grant D., 1993, Deletion 9p and sex reversal, *J Med Genet*, 30, 518–520.
33. Benton M.J., 1990, Phylogeny of the major tetrapod groups: morphological data and divergence dates, *J Mol Evol*, 30, 409–424.
34. 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.
35. Bermudez-Humaran L.G., Garcia-Garcia A., Leal-Garza C.H., Riojas-Valdes V.M., Jaramillo-Rangel G., Montes-de-Oca-Luna R., 2002, Molecular Sexing of Monomorphic Endangered Ara Birds, *J Exp Zool*, 292, 677–680.
36. Black IV W.C., 1993, PCR with arbitrary primers: approach with care, *Insect Mol Biol*, 2, 1–6.
37. Blecher S.R., Erickson R.P., 2007, Genetics of sexual development: a new paradigm, *Am J Med Genet*, 143, 3054–3068.
38. Boersma P.D., Davies E.M., 1987, Sexing Monomorphic Birds by Vent Measurements, *Auk*, 104, 4, 779–783.
39. Bonin S., Hlubek F., Benhattar J., Denkert C., Dietel M., Fernandez P., Höfler G., Kothmaier H., Kruslin B., Mazzanti C., Perren A., Popper H., Scarpa A., Soares P., Stanta G., Groenen P., 2010, Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues, *Virchows Arch*, 457:309–317.
40. Bosé M., Le Gouar P., Arthur C., Lambourdière J., Choisy J.P., Henriquet S., Lecuyer P., Richard M., Tessier C., Sarrazin F., 2007, Does sex matter in reintroduction of griffon vultures (*Gyps fulvus*)?, *Oryx*, 41, 503–8.
41. 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.
42. Bradshaw C.J.A., Harcourt R.G., Lloyd S.D., 2003, Malebiased sex ratios in New Zealand fur seal pups relative to environmental variation, *Behav Ecol Sociobiol*, 53, 297–307.

43. Brady R.S., Paruk J.D., Kern J.A., 2009, Sexing adult Northern Shrikes using DNA, morphometrics, and plumage, *J Field Ornithol*, 80, 2, 198–205.
44. Bramwell R.K., 2003, Sexing chicks in the backyard flock, *Avian Advice*, 5, 4-5.
45. Bravo V., Rosero S., Ricordi C., Pastori R.L., 2007, Instability of miRNA and cDNA derivatives in RNA preparations, *Biochem Bioph Res Co*, 353, 1052-1055.
46. Browder L.W., Erickson C.A., Jeffery W.R., 1991, Organogenesis: gonad development and sex differentiation in: *Developmental Biology*, Browder L. W., Erickson C. A. and Jeffery W. R. (eds), *Saunders College Publishing, Philadelphia*, 661–683.
47. 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
48. Brubaker J., Karouna-Renier N., Chen Y., Jenko K., Sprague D., Henry P., 2011, A noninvasive, direct real-time PCR method for sex determination in multiple avian species, *Mol Ecol Resour*, 11, 415–417.
49. Brzoska, P.M., Chen, H., Levin, N.A., Kuo, W.L., Collins, C., Fu, K.K., Gray, J.W., Christman, M.F., 1996, Cloning, mapping, and in vivo localization of a human member of the PKCI-1 protein family (PRKCNH1), *Genomics*, 36, 151–156.
50. Bull J.J., 1983, *Evolution of sex determining mechanisms*. Menlo Park (CA): Benjamin/Cummings Publishing Company.
51. Bush K.L., Dyte C.K., Moynahan B.J., Aldridge C.L., Sauls H.S., Battazzo A.M., Walker B.L., Doherty K.E., Tack J., Carlson J., 2011, Population structure and genetic diversity of greater sage-grouse (*Centrocercus urophasianus*) in fragmented landscapes at the northern edge of their range, *Conserv Genet*, 12, 527– 42.
52. Bush K.L., Vinsky M.D., Aldridge C.L., Paszkowski C.A., 2005, A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of greater sage-grouse (*Centrocercus uropihasianus*), *Cons Gen*, 6, 867-870.
53. Casey A., Jones K., Sandercock B., Wisely S., 2009, Heteroduplex molecules cause sexing errors in a standard molecular protocol for avian sexing, *Mol Ecol Resour*, 9, 61–65.
54. Cate C., 1985, On sex differences in sexual imprinting, *Anim Behav*, 33, 4, 1310-1317.
55. Cate C., Vos D., 1999, Sexual Imprinting and Evolutionary Processes in Birds: A Reassessment, *Adv Stud Behav*, 28, 1-31.

56. Cerit H, Avanus K, 2007, Sex identification in avian species using DNA typing methods, *World Poultry Sci J*, 63, 91-99.
57. Cerit H., Avanus K., 2007, Sex identification by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes in *Nymphicus hollandicus*, *Turk J Vet Anim Sci*, 31, 6, 371-374.
58. Chang H.W., Cheng C.A., Gu D.L., Chang C.C., Su S.H., Wen C.H., Chou Y.C., Chou T.C., Yao C.T., Tsai C.L., Cheng C.C., 2008, High-throughput avian molecular sexing by SYBR Green-based real-time PCR combined with melting curve analysis, *BMC Biotechnol*, 8, 12.
59. Chang H.W., Gu D.L., Su S.H., Chang C.C., Cheng C.A., Huang H.W., Yao C.T., Chou C.T., Chuang L.Y., Cheng C.C., 2008, High-throughput gender identification of Accipitridae eagles with real-time PCR using TaqMan probes, *Theriogenology*, 70, 83-90.
60. Charlesworth D., Mank J., 2010, The Birds and the Bees and the Flowers and the Trees: Lessons from Genetic Mapping of Sex Determination in Plants and Animals, *Genetics*, 186, 1, 9-31.
61. Charlesworth B., 1996 The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation, *Curr Biol*, 6, 149-162.
62. Charlesworth B., Coyne J.A., Barton N.H., 1987, The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes, *Am Nat*, 130, 113-146.
63. Chen X., Sullivan P.F., 2003, Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput, *Pharmacogenomics J*, 3, 77-96.
64. Cheng M., Lehrman D., 1975, Gonadal hormone specificity in the sexual behavior of ring doves, *Psychoneuroendocrinology*, 1,1, 95-102.
65. Cheong S., Sung H.C., Park S.R., 2007, A new method for sexing Oriental White Storks, *J Field Ornithol*, 7, 3, 329-333.
66. Chojnowski J., Kimball R., Braun E., 2008, Introns outperform exons in analyses of basal avian phylogeny using clathrin heavy chain genes, *Gene*, 410, 1, 89-96.
67. Chou T.C., Yao C.T., Su S.H., Hung Y.C., Chen W.S., Cheng C.C., Tseng C.N., Wang H.M., Chou Y.C., Li S.S., Gu D.L., Chang H.W., 2010, Validation of *Spilornis cheela* *hoya* TaqMan probes for potential gender identification of many Accipitridae species, *Theriogenology*, 73, 404 -11.
68. Christidis L, 1985, A rapid procedure for obtaining chromosome preparations from birds, *Auk*, 102, 892-893.
69. Claridge G., Chea-Leth V., Chhoan IV, 2005, The effectiveness of law enforcement against forest and wildlife crime, A study of enforcement disincentives and other relevant factors in Southwestern Cambodia,

- East-West Management Institute, Conservation International and USAID http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pnadf439.pdf. Accessed 21 Mar 2008
70. Clinton M., 1994, A rapid protocol for sexing chick embryos, *Anim Genet*, 25, 361-362.
 71. Clinton M., Zhao D., Nandi S., McBride D., 2012, Evidence for avian cell autonomous sex identity (CASI) and implications for the sex-determination process?, *Chromosome Res*, 20, 177-190.
 72. Clinton M., Haines L.C., 1999, An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds, *Cell Mol Life Sci*, 55, 6-7, 876-886.
 73. Clinton M., 1998, Sex determination and gonadal development: a bird's eye view, *J Exp Zool*, 281, 457-465.
 74. Clinton M., Haines L., Belloir B., McBride D., 2001, Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol, *Brit Poultry Sci*, 42, 134-138.
 75. Clutton-Brock T.H., 1986, Sex ratio variation in birds, *Ibis*, 128, 3, 317-329.
 76. Cockburn A., Legge S., Double, M.C., 2002, Sex ratios in birds and mammals: can the hypotheses be disentangled? in: *Sex Ratios: Concepts and Research Methods* (ed. I.C.W. Hardy), Cambridge University Press, Cambridge, UK, 267-286.
 77. Cook D., Roberts M., Lowther J., 2002, The international wildlife trade and organised crime: a review of the evidence and the role of the UK. Gdalming: WWF-UK
 78. Cortés O., Barroso A., Dunner S., 1999, Avian sexing: an optimized protocol using polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism, *J Vet Diagn Invest*, 11, 297-9.
 79. 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.
 80. Courchamp F., Angulo E., Rivalan P., Hall R.J., Signoret L., Bull L., Meinard Y., 2006, Rarity value and species extinction: the anthropogenic allee effect, *Plos Biol*, 4, 2405-2410.
 81. Crook J.H., 1964, The Evolution of Social Organisation and Visual Communication in the Weaver Birds (Ploceinae), *Behaviour*, Supplement, 10.
 82. Curran S., 1992, Fetal sex determination in cattle and horses by ultrasonography, *Theriogenology*, 37, 17-21.

83. D'Aloia M.A., Paul Eastham C., 2000, DNA-based sex identification of falcons and its use in wild studies and captive breeding, *Zool Middle East*, 20, 25-32.
84. Dawson D., Darby S., Hunter F., Krupa A., Jones I., Burke T., 2001, A critique of avian CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets, *Mol Ecol Notes*, 1, 201-204.
85. De Vries G., 2004, Minireview: Sex Differences in Adult and Developing Brains: Compensation, Compensation, Compensation, *Endocrinology*, 145, 3, 1063-1068.
86. Delhanty J.D.A., 1989, Rapid chromosomal sexing of birds by direct and short term culture techniques, *Vet Rec*, 125, 92.
87. Delmas V., Stokes D., Perry R., 1993, A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 2414-2418.
88. Donald P., 2007, Adult sex ratios in wild bird populations, *Ibis*, 149, 4, 671-692.
89. Duan W., Fuerst P., 2001, Isolation of a sex-linked DNA sequence in cranes, *J Hered*, 92, 392-397.
90. 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.
91. 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.
92. Eisen J.A., Sweder K.S., Hanawalt P.C., 1995, Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions, *Nucleic Acids Res*, 23, 2715-2723.
93. Ellegren H., Fridolfsson A.K., 1997, Male-driven evolution of DNA sequences in birds, *Nat genet*, 17, 182-184.
94. Ellegren H., 1996, First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing on non-ratite birds, *P R Soc B*, 263, 1635-1641.
95. Ellegren H., 2001, Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z or W?, *EMBO reports*, 21, 31, 192-196.
96. Ellegren H., 2000, Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination, *Trends Ecol Evol*, 15, 188-192.
97. Ellegren H., Fridolfsson A.K., 1997, Male-driven evolution of DNA sequences in birds, *Nat Genet*, 17, 182-184.

98. Ellegren H., Hultin-Rosenberg L., Brunstrom B., Dencker L., Kultima K., Scholz B., 2007, Faced with inequality: chicken do not have a general dosage compensation of sex-linked genes, *BMC Biology*, 5, 40.
99. Elliot L.R., 1978, Sex determination of birds, *Iowa State Univ Vet*, 40, 100-103.
100. Ellsworth D.L., Rittenhouse K.D., Honeycutt R.L., 1993, Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns, *Biotechniques*, 14, 214-217.
101. Escriba M.J., Vaalbuena D., Remohi J., Pellicer A., Simon C., 2002. New techniques on embryo manipulation, *J Reprod Immunol*, 55, 149-161.
102. Fan H, Chu JY., 2007, A brief review of short tandem repeat mutation, *Genomics Proteomics Bioinform*, 5, 7-14.
103. Fechheimer N. S., 1990, Chromosomes of Chickens, *Academic Press, London*
104. Feduccia A., 1995, Explosive Evolution in Tertiary Birds and Mammals, *Science*, 267, 5198, 637-638.
105. Fisher R.A., 1930, The General Theory of Natural Selection, *Clarendon Press, Oxford, UK*
106. Forster C., Sampson S., Chiappe L., Krause D., 1998, The Theropod Ancestry of Birds: New Evidence from the Late Cretaceous of Madagascar, *Science*, 279, 5358, 1915-1919.
107. Freed L.A., Cann R.L., Diller K., 2009, Sexual dimorphism and the evolution of seasonal variation in sex allocation in the Hawaii Akepa, *Evol Ecol Res*, 11, 731-57.
108. Fridolfsson A., Ellegren H., 1999, A simple and universal method for molecular sexing of non- ratite birds, *J Avian Biol*, 30, 116-121.
109. Fridolfsson A., Ellegren H., 2000, Molecular evolution of the avian CHD1 genes on the Z and W chromosomes, *Genetics*, 155, 1903-1912.
110. 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.
111. Fujimoto T., Ukeshima A., Kiyofuji R., 1976, The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo, *Anat Rec*, 185, 139-153.
112. Gahr M., 2001, Distribution of sex steroid hormone receptors in the avian brain, Functional implications for neural sex differences and sexual behaviors, *Microsc Res Techniq*, 55, 1, 1-11.

113. Gahr M., 2003, Male Japanese Quails with female brains do not show male sexual behaviors, *P Natl Acad Sci Usa*, 100, 7959–7964.
114. 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
115. 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.
116. Garcia - Moreno J., Mindell D., 2000, Rooting a Phylogeny with Homologous Genes on Opposite Sex Chromosomes (Gametologs): A Case Study Using Avian CHD, *Mol Biol Evol*, 17, 12, 1826–1832.
117. García C.B., Insausti J.A., Gil J.A., de Frutos A., Alcántara M., González J., Cortés M.R., Bonafonte J.I., Arruga M.V., 2008, Comparison of different procedures of DNA analysis for sex identification in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*), *Eur J Wildl Res*, 55, 3, 309-312.
118. 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.
119. Gaunt, A.S., Oring L.W., eds. 1999, *Guidelines to the Use of Wild Birds in Research*, 2nd ed. Ornithological Council, Washington, D.C.
120. Genovart M., Louzao M., Igual J.M., Oro D., 2008, Digit length may reveal unusual breeding behaviour in a seabird, *Biol Lett*, 4, 461– 464.
121. Gilchrist B.M., Haldane J.B.S., 1947, Sex linkage and sex determination in a mosquito, *Culex Molestus*, *Hereditas*, 33, 175–190.
122. Glavac D., Dean M., 1993, Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations, *Hum Mutat*, 2, 404–414
123. 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.
124. Graves J.A.M., 2003, Sex and death in birds: a model of dosage compensation that predicts lethality of sex chromosome aneuploids, *Cytogenet Genome Res*, 101, 278-282.
125. Graves J.A.M., Peichel C., 2010, Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options?, *Genome Biol*, 11, 205.

126. Graves J.A.M., Shetty S., 2000, The evolution of sex chromosomes in higher vertebrates, in Clark M (ed): *Comparative Genomics*, Kluwer Academic Publishers, Boston, 153–205.
127. Graves J.A.M., 2008, Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes, *Annu Rev Genet*, 42, 565–586
128. Greenwood A.G., 1983, Avian sex determination by laparoscopy, *Vet Rec*, 112, 105.
129. Greenwood P., 1980, Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals, *Animal Behav*, 28, 4, 1140-1162.
130. Griffin, D.K., Robertson, L.B., Tempest, H.G., Skinner, B.M., 2007, The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics, *Cytogenet Genome Res*, 117, 64–77.
131. Griffiths R., Daan S., Dijkstra C., 1996, Sex identification in birds using two CHD genes, *P Roy Soc B-Biol Sci*, 263, 1374, 1251-1256.
132. Griffiths R., Double M., Orr K., Dawson R., 1998, A DNA test to sex most birds, *Mol Ecol*, 7, 1071–1075.
133. Griffiths R., Korn R.M., 1997, A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus do domesticus*, *Gene*, 197, 225–229.
134. 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.
135. Griffiths R., Phil D., 2000, Sex identification in birds, *Semin Avian Exot Pet*, 9, 14-26.
136. Griffiths R., 2000, Sex identification using DNA markers, in: *Molecular methods in ecology* (Backer A. J., Ed.), Blackwell Science, London, 295–321.
137. Griffiths R., Tiwari B., 1993, The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 8324-8326.
138. Griffiths R., Tiwari B., 1995, Sex of the last wild Spix's macaw, *Nature*, 375, 454.
139. 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.
140. Guioli S., Lovell-Badge R., 2007, PITX2 controls asymmetric gonadal development in both sexes of the chick and can rescue the degeneration of the right ovary, *Development*, 134, 4199–4208.
141. Hake L., O'Connor C., 2008, Genetic Mechanisms of Sex Determination, *Nature Education*, 1, 1.

142. Hallgrimsson G.T., Palsson S., Summers R.W., 2008, Bill length: a reliable method for sexing Purple Sandpipers, *J Field Ornithol*, 79, 87-92.
143. Hamburger V., Hamilton H.L., 1951, A series of normal stages in the development of the chick embryo, *J Morphol*, 88, 49-92.
144. Han J.I., Jang H.J., Cheong S., Kim S., Park S.R., Na K.J., 2009b, Sex Determination by PCR-RFLP in the Oriental White Stork *Ciconia boyciana*, *Zool Stud*, 48, 5, 619-624.
145. Han J.I., Kim J.H., Sim S., Park S.R., Na K.J., 2009a, A Simple and Improved DNA Test for Avian Sex Determination, *Auk*, 126, 4, 779-783.
146. Handel C. M., Pajot L.M., Talbot S.L., Sage G.K., 2006, Use of buccal swabs for sampling DNA from nestling and adult birds, *Wildlife Soc B*, 34, 1094-1100.
147. Handley L.J., Ceplitis H., Ellegren H., 2004, Evolutionary strata on the chicken Z chromosome: implications for sex chromosome evolution, *Genetics*, 67, 1, 367-376.
148. Harvey M.G., Bonter D.N., Stenzler L.M., 2006, A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing, *J Field Ornithol*, 77, 136-140.
149. Harz M., Krause M., Bartels T., Cramer K., Rosch P., Popp J., 2008, Minimal Invasive Gender Determination of Birds by Means of UV-Resonance Raman Spectroscopy, *Anal Chem*, 80, 1080-1086.
150. He P.J., Yu J.Q., Fang S.G., 2005, Sex identification of the black swan (*Cygnus atratus*) using the locus-specific PCR and implications for its reproduction, *Reprod Domest Anim*, 40, 196-198.
151. Heinsohn R., Legge S., Endler J.A., 2005, Extreme reversed sexual dichromatism in a bird without sex role reversal, *Science*, 309, 617-619.
152. Hildebrandt Y., Pitra C., Sommer P., Pinkowski M., 1995, Sex identification in birds of prey by ultrasonography, *J Zoo Wildlife Med*, 26, 367-376.
153. Hochbaum H.A., 1942, Sex and age identification of ducks by cloacal examination, *Trans N Amer Wildl Conf*, 7, 299-307
154. 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.
155. Huang M.C., Lin W.C., Horng Y.M., Rouvier R., Huang C.W., 2003, Female-specific DNA sequences in geese, *Brit Poultry Sci*, 44, 3, 359-364.

156. Hudson Q.J., Smith C.A., Sinclair A.H., 2005, Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary, *Dev Dynam*, 233, 1052–1055.
157. Idaghdour Y., Broderick D., Korrida A., 2003, Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards in Morocco, *Conserv Genet*, 4, 789–792.
158. Ingram K.A., 1980, Oscope technique for Sexing Birds, in *Current Veterinary Therapy VII*. (Edit by Kirk RW), W.B. Saunders, Philadelphia, 656-658.
159. Ishimaru Y., Komatsu T., Kasahara M., Katoh-Fukui Y., Ogawa H., Toyama Y., Maekawa M., Toshimori K., Chandraratna R.A.S., Morohashi K., Yoshioka H., 2008, Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos, *Development*, 135, 677–685.
160. 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.
161. 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., Lusia A.J., Arnold A.P., 2007, Dosage compensation is less effective in birds than in mammals, *J Biol*, 6, 2.
162. Jarvi S.I., Farias M.E.M., 2006, Molecular sexing and sources of CHD1-Z/W sequence variation in Hawaiian birds, *Mol Ecol Notes*, 6, 1003–1005.
163. Jensen T., Mace M., Durrant B., 2011, Sexing of mid-incubation avian embryos as a management tool for zoological breeding programs, *Zoo Biol*, 31, 6, 694-704.
164. Jensen T., Pernasetti F.M., Durrant B., 2003, Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers, *Zoo Biol*, 22, 561–571.
165. 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.
166. 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.
167. Jones K.L., Glenn T.C., 2012, Screening of the Gamu-7 microsatellite locus to determine the sex of captive whooping cranes; updated 1999, Promega Corporation Web site. Available at: <http://www.promega.com/resources/articles/pubhub/enotes/screeni>

- ng-of-the-gamu7-microsatellite-locus-to-determine-the-sex-of-captive-whooping-cranes/ Accessed 23 December 2012
168. Kahn N.W., Quinn T.W., 1999, Male-driven evolution among Eoaves? A test of the replicative division hypothesis in a heterogametic female (ZW) system, *J Mol Evol*, 49, 750-759.
 169. Kakavas V.K., Plageras P., Vlachos T.A., Papaioannou A., Noulas V.A., 2008, PCR-SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases, *Mol Biotechnol*, 38, 155-163.
 170. 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
 171. Kelkar Y.D., Strubczewski N., Hile S.E., Chiaromonte F., Eckert K.A., Makova K.D., 2010, What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats, *Genome Biol Evol*, 2, 620-635.
 172. Kent J., Wheatley S.C., Andrews J.E., Sinclair A.H., Koopman P., 1996, A male-specific role for Sox9 in vertebrate sex determination, *Development*, 122, 2813-2822.
 173. 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.
 174. Kettlewell J.R., Raymond C.S., Zarkower D., 2000, Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation, *Genesis*, 26, 174-178.
 175. Kobayashi A., Chang H., Chaboissier M.C., Schedl A., Behringer R.R., 2005, Sox9 in testis determination, *Ann Ny Acad Sci*, 1061, 9-17.
 176. Kofidi 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.
 177. Koopman P., 2001, Sry, Sox9 and mammalian sex determination, *EXS*, 91, 25-56.
 178. Koopman P., Loffler K.A., 2003, Sex determination: the fishy tale of Dmrt1, *Curr Biol*, 13, R177-R179.
 179. Krackow S., 1995, Potential Mechanisms for sex ratio adjustment in mammals and birds, *Biol Rev*, 70, 2, 225-241.
 180. Kuroda Y., Arai N., Arita M., Teranishi M., Hori T., Harata M., Mizuno S., 2001, Absence of Z-chromosome inactivation for five genes in male chickens, *Chromosome Res*, 9, 457-468.

181. Kuroiwa A., 2009, No final answers yet on sex determination in birds, *Nature*, 462, 34.
182. Kuroiwa A., Yokomine T., Sasaki H., Tsudzuki M., Tanaka K., Namikawa T., Matsuda Y., 2002, Biallelic expression of Z-linked genes in male chickens, *Cytogenet Genome Res*, 99, 310-314.
183. Lack D., 1968, Ecological adaptations for breeding in birds, *London: Methuen*
184. Leader-Williams N., Milner-Gulland E.J., 1993, Policies for the enforcement of wildlife laws: the balance between detection and penalties in Luangwa Valley, Zambia, *Conserv Biol*, 7, 611-617.
185. Lee J., Tsai L., Hwa P., Chan C., Huang A., Chin S., Wang L., Lin J., Linacre A., Hsieh H., 2010, A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene, *Mol Cell Probe*, 24, 27-31.
186. Lee M., Hong Y., Park S., Kim Y., Choi T., Lee H., Min M., 2008, Application of two complementary molecular sexing methods for East Asian bird species, *Genes Genom*, 30, 365-372.
187. Legendre S., 2004, Age structure, mating system and population viability, in *Evolutionary Conservation Biology* (eds R. Ferrière, U. Dieckmann & D. Couvet), *Cambridge University Press, Cambridge, UK*, 41-58.
188. Legendre S., Clobert J., Møller A.P., Sorci G., 1999, Demographic stochasticity and social mating system in the process of extinction of small populations: the case of passerines introduced to New Zealand, *Am Nat*, 153, 449-463.
189. Lens L., Galbusera P., Brooks T., Waiyaki E., Schenck T., 1998, Highly skewed sex ratios in the critically endangered Taita thrush as revealed by CHD genes, *Biodivers Conserv*, 7, 869-873.
190. Lessells C.M., Mateman A.C., 1998, Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, *Mol Ecol*, 7, 187-195.
191. Lewis S., Benvenuti S., Dall'Antonia L., Griffiths R., Money L., Sherratt T.N., Wanless S., Hamer K.C., 2002, Sex-specific foraging behaviour in a monomorphic seabird, *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 269, 1687-93.
192. Li Y.M., Gao Z.X., Li X.H., Wang S., Niemela J., 2000, Illegal wildlife trade in the Himalayan region of China, *Biodiv Conserv*, 9, 901-918.
193. Lin M., Thorne M.H., Martin I.C.A., Sheldon B.L., Jones R.C., 1995, Development of the gonads in the triploid (ZZW and ZZZ) fowl, *Gallus domesticus*, and comparison with normal diploid males (ZZ) and females (ZW), *Reprod Fert Dev*, 7, 1185-1197.

194. Lombardo M., Bosman R., Faro C., Houtteman S., 1994, Homosexual Copulations by Male Tree Swallows, *Wilson Bull*, 106, 3, 555-557.
195. 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.
196. Lunn J., 1948, Chick Sexing, *Am Sci*, 36, 2, 280-287.
197. MacFarlane G., Blomberg S., Vasey P., 2010, Homosexual behaviour in birds: frequency of expression is related to parental care disparity between the sexes, *Anim Behav*, 80, 3, 375-390.
198. 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.
199. Marks J., Leasure S., 1992, Breeding biology of Tristram's Storm-Petrel on Laysan Island, *Wilson Bull*, 104, 719-731.
200. Marrero P., Fregel R., Cabrera V., Nogales M., 2009, Extraction of high-quality host DNA from feces and regurgitated seeds: a useful tool for vertebrate ecological studies, *Biol Res*, 42, 147-151.
201. Graves, J.A.M., 2008, Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes, *Annu Rev Genet*, 42, 565-586.
202. 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.
203. Matsubara K., Tarui H., Toriba M., Yamada K., Nishida-Umehara C., Agata K., Matsuda Y., 2006, Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes, *PNAS*, 103, 48, 18190-18195.
204. Maurer G., Beck N., Double M.C., 2010, A 'feather-trap' for collecting DNA samples from birds, *Mol Ecol Res*, 10, 129-134.
205. Mays H., Doucet S., Yao C.T., Yuan H.W., 2006, Sexual dimorphism and dichromatism in Steere's Liocichla (*Liocichla steerii*), *J Field Ornithol*, 77, 4, 437-443.
206. McCarrey J.R., Abbott U.K., 1979, Mechanisms of genetic sex determination, gonadal sex differentiation and germ-cell development in animals, *Adv Genet*, 20, 217-289.
207. McDonald S.E., 1996, Endoscopy. In: Roskopf, W.J., Woerpel, R.W. (Eds.), Disease of cage and aviary birds, *William and Wilkins Co., Baltimore*, 699-717.
208. McMillan M., 1988, Imaging of Avian Urogenital Disorders, *AAV Today*, 2, 2, 74-82.

209. McQueen, H.A., Clinton, M., 2009, Avian sex chromosomes: dosage compensation matters, *Chromosome Res*, 17, 687–697.
210. McVean G.T., Hurst L.D., 1997, Evidence for a selectively favourable reduction in the mutation rate of the X chromosome, *Nature*, 386, 388–395.
211. Melamed E., Arnold A.P., 2007, Regional differences in dosage compensation on the chicken Z chromosome, *Genome Biol*, 8, R202.
212. Mendenhall C., Sekercioglu C., Brenes F., 2010, Using interpubic distance for sexing Manakins in the field, *J Field Ornithol*, 81, 49–63.
213. Mine O.M., Mochakana M.E., Mpapho T., Motlhanka D.T.M., Kgwatalala P., 2002, Application of a sex identification technique in juvenile ostriches and its potential application in Botswana, *S Afr J Anim Sci*, 32, 160–163.
214. Mittwoch U., 2005, Sex Determination in Mythology and History, *Arq Bras Endocrinol Metab*, 49, 1, 7-13.
215. 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.
216. Miyata T., Hayashida H., Kuma K., Mitsuyasu K., Yasunaga T., 1987, Male-driven molecular evolution: a model and nucleotide sequence analysis, *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 52, 863–867.
217. Mizuno S., Kunita R., Nakabayashi O., Kuroda Y., Arai N., Harata M., Ogawa A., Itoh Y., Teranishi M., Hori T., 2002, Z and W chromosomes of chickens: studies on their gene functions in sex determination and sex differentiation, *Cytogenet Genome Res*, 99, 236–244.
218. Mizuta T., Yamada H., Lin R., Yodogawa Y., Okanoya K., 2003, Sexing White-rumped Munias in Taiwan, using morphology, DNA and distance calls, *Ornithol Sci*, 2, 97–102.
219. Monteiro L., Bonnemaïson D., Vekris A., Petry K.G., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J., Mégraud F., 1997, Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model, *J Clin Microbiol*, 35, 4, 995-998.
220. 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.
221. Morinha F., Magalhães P., Ferro A., Guedes-Pinto H., Rodrigues R., Bastos E., 2011, Advances in molecular sexing of birds: a high-resolution melting-curve analysis based on CHD1 gene applied to *Coturnix spp.*, *Ann Zool Fenn*, 48, 371–375.

222. Murray B.G., 1991, Measuring Annual Reproductive Success, with Comments on the Evolution of Reproductive Behavior, *Auk*, 108, 4, 942-952.
223. Naim D.M., Nor S.A.M., Baharuddin M.H., 2011, Non-invasive sex identification of the white-bellied sea eagle (*Haliaeetus leucogaster*) through genetic analysis of feathers, *Genet Mol Res*, 10, 4, 2505-2510.
224. Nakabayashi O., Kikuchi H., Kikuchi T., Mizuno S., 1998, Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos, *J Mol Endocrinol*, 20, 193-202.
225. 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.
226. Nanda I., Kondo M., Hornung U., Asakawa S., Winkler C., Shimizu A., Shan Z., Haaf T., Shimizu N., Shima A., Schmid M., Schartl M., 2002, A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*, *PNAS*, 99, 18, 11778-11783
227. Nanda I., Zend-Ajusch E., Shan Z., Grützner F., Schartl M., Burt D.W., Koehler M., Fowler V.M., Goodwin G., Schneider W.J., Mizuno S., Dechant G., Haaf T., Schmid M., 2000, Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination, *Cytogenet Cell Genet*, 89, 67-78.
228. Nanda I., Shan Z., Schartl M., Burt D.W., Koehler M., Nothwang H., Grutzner F., Paton I.R., Windsor D., Dunn I., Engel W., Staeheli P., Mizuno S., Haaf T., Schmid M., 1999, 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9, *Nature Genetics*, 21, 258-259.
229. Nesje M., Røed K.H., 2000, Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers, *Hereditas*, 132, 261-263.
230. Ngun T.C., Ghahramani N., Sanchez F.J., Bocklandt S., Vilain E., 2011, The genetics of sex differences in brain and behavior, *Front Neuroendocrinol*, 32, 227-246.
231. Nielsen S., Houe H., Thamsborg S., Bitsch V., 2000, Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*, *J Vet Diagn Invest*, 13, 164-166.
232. Nishikimi H., Kansaku N., Saito N., Usami M., Ohno Y., Shimada K., 2000, Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken, *Mol Reprod Dev*, 55, 20-30.

233. Normile D., 2004, Invasive species—expanding trade with China creates ecological backlash, *Science*, 306, 968–969.
234. O’Neill M., Binder M., Smith C., Andrews J., Reed K., Smith M., Millar C., Lambert D., Sinclair A., 2000, ASW, a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad, *Dev Genes Evol*, 210, 243–249.
235. 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.
236. Oguma K., 1938, Studies on sauropsid chromosomes, *V Annot Zool Japan*, 17, 612–622.
237. Ohno S., Stenius C., Christian L.C., Becak W., Becak M.L., 1964, Chromosomal uniformity in the avian subclass Carinatae, *Chromosoma*, 15, 280–288
238. Ohno S., 1967, Sex chromosomes and sex-linked genes, *Springer, New York*.
239. Ong A., Vellayan S., 2008, An evaluation of CHDspecific primer sets for sex typing of birds from feathers, *Zoo Biol*, 27, 62–69.
240. Oreal E., Pieau C., Mattei M.G., Josso N., Picard J.Y., Carre-Eusebe D., Magre S., 1998, Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression, *Dev Dynam*, 212, 522–532.
241. Owens I., 2002, Male-only care and classical polyandry in birds: phylogeny, ecology and sex differences in remating opportunities, *Phil Trans R Soc Lond B*, 357, 283–293.
242. Parks K.P., Seidle H., Wright N., Sperry J.B., Bieganowski P., Howitz K., Wright D.L., Brenner C., 2004, Altered specificity of Hint-W123Q supports a role for Hint inhibition by ASW in avian sex determination, *Physiol Genomics*, 20, 12–14.
243. Parsons B.L., Heflich R.H., 1997, Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations, *Mutat Res*, 387, 97–121.
244. Payne R.B., 1979, Sexual selection and intersexual differences in variance of breeding success, *Am Nat*, 114, 447–466.
245. Pazin M.J., Kadonaga J.T., 1997, SWI2/SNF2 and Related Proteins: ATP-Driven Motors That Disrupt-Protein–DNA Interactions?, *Cell*, 88, 737–740.

246. Perrin F.M.R., Stacey S., Burgess A.M.C., Mittwoch U., 1995, A quantitative investigation of gonadal feminization by diethylstilbestrol of genetically male embryos of the quail, *J Reprod Fertil*, 103, 223-226.
247. Peter H.U., Kaiser M., Gebauer A., 1991, Breeding Ecology of the Southern Giant Petrels *Macronectes giganteus* on King George Island (South Shetland Islands, Antarctic), *Zool Jahrb Abt Anat Ontog Tiere*, 118, 465-477.
248. Peters D., Grubb T., 1983, An Experimental Analysis Of Sex-Specific Foraging In The Downy Woodpecker, *Picoides Pubescens*, *Ecology*, 64, 6, 1437-1443.
249. 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
250. Podos J., 2001, Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin's finches, *Nature*, 409, 185-188.
251. Prus S.E., Schmutz S.M., 1987, Comparative efficiency and accuracy of surgical and cytogenetic sexing in Psittacines, *Avian Dis*, 31, 2, 420-424.
252. 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.
253. Ramos P.S., Bastos E., Mannan R.W., Guedes-Pinto H., 2009, Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism applied to sex identification of *Accipiter cooperii*, *Mol Cell Probe*, 23, 115-118.
254. Raudsepp T., Lee E.J., Kata S.R., Brinkmeyer C., Mickelson J.R., Skow L.C., Womack J., Chowdhary B., 2004, Exceptional conservation of horse-human gene order on X chromosome revealed by high-resolution radiation hybrid mapping, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 2386-2391.
255. Raymond C.S., Kettlewell J.R., Hirsch B., Bardwell V.J., Zarkower D., 1999, Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development, *Dev Biol*, 215, 208-220.
256. 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.
257. Risser A.C., 1971, A Technique for Performing Laparotomy on Small Birds, *Condor*, 73, 376-379.

258. Robertson B., Minot E., Lambert D., 1999, Molecular sexing of individual kakapo, *Strigops habroptilus* Aves, from faeces, *Mol Ecol*, 8, 8, 1349-1350.
259. Robertson B.C., Gemmell N.J., 2006, PCR-based sexing in conservation biology: Wrong answers from an accurate methodology?, *Conserv Genet*, 7, 267-271.
260. Rodriguez-Leon J., Rodriguez Esteban C., Marti M., Santiago-Josefat B., Dubova I., Rubiralta X., Izpisua Belmonte J.C., 2008, Pitx2 regulates gonad morphogenesis, *P Natl Acad Sci Usa*, 105, 11242-11247.
261. Romanoff A.L., 1960, *The Avian Embryo*, Macmillan, New York
262. Rosenthal N.F., Ellis H., Shioda K., Mahoney C., Coser K.R., Shioda T., 2010, High-throughput applicable genomic sex typing of chicken by TaqMan real-time quantitative polymerase chain reaction, *Poult Sci*, 89, 1451-1456.
263. Ross Diana G.F., Bowles J., Koopman P., Lehnert S., 2008, New insights into SRY regulation through identification of 5' conserved sequences, *BMC Mol Biol*, 9, 85.
264. 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.
265. Sacchi P., Soglia D., Maione S., Meneguz G., Campora M., Rasero R., 2004, A non-invasive test for sex identification in short-toed eagle (*Circaetus gallicus*), *Mol Cell Probes*, 18, 193-196.
266. 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*), *Mol Cell Probes*, 18, 193-196.
267. 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.
268. Salem H.H., Ali B.A., Huang T.H., Qin D.N., 2005, Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in poultry research, *Int J Poult Sci*, 4, 804-811.
269. Sarrazin F., Legendre S., 2000, Demographic approach to releasing adults versus young in reintroductions, *Conserv Biol*, 14, 488-500.
270. Sato Y., Sugie R., Tsuchiya B., Kameya T., Natori M., Mukai K., 2001, Comparison of the DNA Extraction Methods for Polymerase Chain Reaction Amplification from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues, *Diagn Mol Pathol*, 10, 4, 265-271.

271. Satterfield W.C., 1980, Diagnostic laparoscopy in birds, In Current Veterinary Therapy VII. (Edit by Kirk RW), W.B. Saunders, Philadelphia, 659-661.
272. Scheib D., 1983, Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation, *Differentiation*, 23(Suppl.), S87-S92.
273. Schlinger B., 1997, Sex Steroids and Their Actions on the Birdsong System, *J Neurobiol*, 33, 5, 619-631.
274. Schlinger B., 1998, Sexual Differentiation Of Avian Brain And Behavior: Current Views on Gonadal Hormone-Dependent and Independent Mechanisms, *Annu Rev Physiol*, 60, 407-429.
275. Scholz B., Kultima K., Mattsson A., Axelsson J., Brunstrom B., Halldin K., Stigson M., Dencker L., 2006, Sex-dependent gene expression in early brain development of chicken embryos, *BMC Neurosci*, 7, 12.
276. Segelbacher G., 2002, Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples, *Mol Ecol Notes*, 2, 367-369.
277. Seki S.I., 2003, Molecular sexing of individual Ryukyu Robins *Erithacus komadori* using buccal cells as a non-invasive source of DNA, *Ornithol Sci*, 2, 135-137.
278. Sekido R., Lovell-Badge R., 2008, Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer, *Nature*, 453, 930-934.
279. Serventy D.L., 1956, A method of sexing petrels in field observations, *Emu*, 56, 213-215.
280. Shaffer C.D., Wallrath L.L., Elgin S.C.R., 1993, Regulating genes by packaging domains: bits of heterochromatin in euchromatin?, *Trends Genet*, 9, 35-37.
281. Shan Z., Nanda I., Wang Y., Schmid M., Vortkamp A., Haaf T., 2000, Sex-specific expression of an evolutionarily conserved male regulatory gene, DMRT1, in birds, *Cytogenet Cell Genet*, 89, 252-257.
282. Sheldon B., 1998, Recent studies on avian sex ratios, *Heredity*, 80, 397-402.
283. Shetty S., Kirby P., Zarkower D., Graves J.A.M., 2002, DMRT1 in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and discovery of a putative regulatory element, *Cytogenet Genome Res*, 99, 245-251.
284. Shi S.R., Datar R., Liu C., Wu L., Zhang Z., Cote R., Taylor C., 2004, DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution, *Histochem Cell Biol*, 122, 211-218.

285. Shibata K., Takase M., Nakamura M., 2002, The Dmrt1 expression in sex-reversed gonads of amphibians, *Gen Comp Endocrinol*, 127, 232–241.
286. Shimmin L.C., Chang B.H., Li W.H., 1993, Male-driven evolution of DNA sequences, *Nature*, 362, 745–747.
287. Shizuka D., Lyon B., 2008, Improving the reliability of molecular sexing of birds using a W-specific marker, *Mol Ecol Resour*, 8, 1249–1253.
288. Shoemaker C., Ramsey M., Queen J., Crews D., 2007, Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination, *Dev Dynam*, 236, 1055–1063.
289. Sibley C.G., Ahlquist J.E., Monroe B.L., 1988, A classification of the living birds of the world based on DNA-DNA hybridization studies, *Auk*, 105, 409–423.
290. 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.
291. Singh P.B., Miller J.R., Pearce J., Kothary R., Burton R.D., Paro R., James T.C., Gaunt S.J., 1991, A sequence motif found in a Drosophila heterochromatin protein is conserved in animals and plants, *Nucleic Acids Res*, 19, 789–794.
292. Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J., Cordum H.S., Hillier L., Brown L.G., Repping S., Pyntikova T., Ali J., Bieri T., Chinwalla A., Delehaunty A., Delehaunty K., Du H., Fewell G., Fulton L., Fulton R., Graves T., Hou S.F., Latrielle P., Leonard S., Mardis E., Maupin R., McPherson J., Miner T., Nash W., Nguyen C., Ozersky P., Pepin K., Rock S., Rohlfsing T., Scott K., Schultz B., Strong C., Tin-Wollam A., Yang S.P., Waterston R.H., Wilson R.K., Rozen S., Page D.C., 2003, The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes, *Nature*, 423, 825–837.
293. Slagsvold T., Hansen B., Johannessen L., Lifjeld J., 2002, Mate choice and imprinting in birds studied by cross-fostering in the wild, *Proc R Soc Lond B*, 269, 1449–1455.
294. Smith A., 2010, Sex determination in birds: a review, *Emu*, 110, 4, 364–377.
295. Smith K.F., Sax D.F., Lafferty K.D., 2006, Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment, *Conserv Biol*, 20, 1349–1357.
296. Smith C.A., Sinclair A.H., 2004, Sex determination: insights from the chicken, *BioEssays*, 26, 120–132.

297. Smith C.A., McClive P.J., Hudson Q., Sinclair A.H., 2005, Malespecific cell migration into the developing gonad is a conserved process involving PDGF signalling, *Dev Biol*, 284, 337-350.
298. Smith C.A., McClive P.J., Western P.S., Reed K.J., Sinclair A.H., 1999, Conservation of a sex-determining gene, *Nature*, 402, 601-602.
299. Smith C. A., Roeszler K.N., Hudson Q.J., Sinclair A.H., 2007, Avian sex determination: what, when and where?, *Cytogenet Genome Res*, 117, 165-173.
300. Smith C.A., Roeszler K.N., Ohnesorg T., Cummins D.M., Farlie P.G., Doran T.J., Sinclair A.H., 2009a, The avian Z-linked geneDMRT1 is required for male sex determination in the chicken, *Nature*, 461, 267-271.
301. Solari A.J, 1994, Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates, *CRC Press, London*, 43-73.
302. Stainer G., Bartels T., Krautwald-Junghanns M.E., Boos A., Koch E., 2010, Sexing of turkey poults by Fourier transform infrared spectroscopy, *Anal Bioanal Chem*, 396, 465-470.
303. Stefos K., Arrighi F.E., 1971, Heterochromosome in birds, *Expt Cell Rec*, 68, 228-231.
304. Stiglec R., Ezaz T., Graves J., 2007, A new look at the evolution of avian sex chromosomes, *Cytogenet Genome Res*, 117, 103-109.
305. Stokes D.G., Perry R.P., 1995, DNA-binding and chromatin localization properties of CHD1, *Mol Cell Biol*, 15, 5, 2745-2753.
306. Suh A., Kriegs J.O., Brosius J., Schmitz J., 2011, Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution, *Mol Biol Evol*, 28, 2993-2997.
307. Swanson D.A., Rappole J.H., 1992, Determining the sex of adult white-winged doves by cloacal characteristics, *NABB*, 17, 137-139.
308. Sweeney T., Saunders P.T.K., Millar M.R., Brooks A.N., 1997, Ontogeny of anti-mullerian hormone, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and androgen receptor expression during ovine fetal gonadal development, *J Endocrinol*, 153, 27-32.
309. Swengel S.R., 1996, 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.
310. Takagi N., Sasaki M., 1974, A phylogenetic study of bird karyotypes, *Chromosoma*, 46, 91-120.

311. Tegelstrom H., Rytzman H., 1981, Chromosomes in birds (Aves): evolutionary implications of macro- and microchromosome numbers and lengths, *Hereditas*, 94, 225-233.
312. 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.
313. Thorne M.H., Sheldon B.L., 1993, Triploid intersex and chimeric chickens: Useful models for studies of avian sex determination, in: Sex Chromosomes and Sex-Determining Genes, Reed K.C. and Graves J.A.M. (eds), *Harwood Academic Publishers, Australia*, 199-205
314. 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.
315. Tone M., Sakaki Y., Hashiguchi T., Mizuno S., 1984, Genus specificity and extensive methylation of the W-chromosome-specific repetitive DNA-sequences from the domestic fowl, *Gallus-gallus-domesticus*, *Chromosoma*, 89, 228-237
316. Tone M., Nakano N., Takao E., Narisawa S., Mizuno S., 1982, Demonstration of W chromosome-specific repetitive DNA sequences in the domestic fowl, *Gallus g. domesticus*, *Chromosoma* 86, 551-569.
317. Trivers R.L., 1972, Parental investment and sexual selection, in Sexual Selection and the Descent of Man (ed. B. Campbell), *Aldine, Chicago, USA*, 136-179.
318. Turner L., 1953, A rapid method of sexing Canada geese, *J Wildlife Manage*, 17, 542-543.
319. Vaillant S., Dorizzi M., Pieau C., Richard-Mercier N., 2001, Sex reversal and aromatase in chicken, *J Exp Zool*, 290, 727-740.
320. Vali N., Doosti A., 2011, Molecular study for the sex identification in Japanese quails (*Coturnix Japonica*), *Afr J Biotechnol*, 10, 80, 18593-18596.
321. Vallisneri M., Quaglia A., Stagni A.M., Zaccanti F., 1990, Differences between male and female protogonia in chick embryos before sex differentiation of the gonads, *Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale*, 66, 91-98.
322. Veyrunes F., Waters P., Miethke P., Rens W., McMillan D., Alsop A., Grützner F., Deakin J., Whittington C., Schatzkammer K., Kremitzki C., Graves T., Ferguson-Smith M., Warren W., Graves J.A.M., 2008, Bird-like sex

- chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes, *Genome Res*, 18, 965-973.
323. Volff J.N., Kondo M., Schartl M., 2003, Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish, *Trends Genet*, 19, 196-199.
324. 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.
325. Vos P., Hogers R., Bleaker M., Reijans 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.
326. Vučićević M., Stevanović J., Vučićević I., Pantelić A., Đelić N., Resanović R., Stanimirović Z., 2012a, Sex determination in game birds management, *Proceedings of the International symposium, on hunting, »Modern aspects of sustainable management of game population«* Zemun-Belgrade, Serbia, 22. – 24. June, 91-94.
327. Vučićević M., Stevanović J., Simeunović P., Vučićević I., Đelić N., Stanimirović Z., Stojić V., 2012b, 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, Zemun-Belgrade, Serbia, 83-86
328. Wagner R.H., 1996, Male-male mountings by a sexually monomorphic bird: mistaken identity or fighting tactic?, *J Avian Biol*, 2, 7, 209-214.
329. Wang L., Chen C., Lee H., Li S., Lir J., Chin S., Pu C., Wang C., 2007. Sexing a wider range of avian species based on two CHD1 introns with a unified reaction condition, *Zoo Biol*, 26, 425-431.
330. Warchol G.L., 2004, The transnational illegal wildlife trade, *Crim Justice Stud*, 1, 57-73.
331. Wartenberg H., Lenz E., Schweikert H.U., 1992, Sexual differentiation and the germ cell in sex reversed gonads after aromatase inhibition in the chicken embryo, *Andrologia*, 24, 1-6.
332. Waters P., Wallis M., Graves J.A.M., 2007, Mammalian sex – Origin and evolution of the Y chromosome and SRY, *Semin Cell Dev Biol*, 18, 389-400.
333. Wellbrock A., Bauch C., Rozman J., Witte K., 2012, Buccal swabs as a reliable source of DNA for sexing young and adult Common Swifts (*Apus apus*), *J Ornithol*, 153, 3, 991-994.

334. West S.A., Sheldon B.C., 2002, Constraints on the evolution of sex ratio adjustment, *Science*, 295, 1685-1688.
335. Whittingham L.A., Dunn P.O., 2000, Offspring sex ratios in tree swallows: females in better condition produce more sons, *Mol Ecol*, 9, 1123-1129.
336. 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.
337. Woodage T., Basrai M., Baxeovanis A., Hieter P., Collins F., 1997, Characterization of the CHD family of proteins, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 11472-11477.
338. Wu C.P., Horng Y.M., Wang R.T., Yang K.T., Huang M.C., 2007, A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds, *Theriogenology*, 67, 328-333.
339. Yamashina Y., 1994, Karyotype studies in birds, *Cytologia*, 12, 270-296.
340. Yamauchi K., Hamasaki S., Miyazaki K., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y., 2000, Sex Determination Based on Fecal DNA Analysis of the Amelogenin Gene in Sika Deer (*Cervus nippon*), *J Vet Med Sci*, 62, 6, 669-671.
341. Zaccanti F., Vallisneri M., Quaglia A., 1990, Early aspects of sex differentiation in the gonads of chick embryos, *Differentiation*, 43, 71-80
342. Zhao Y., Kong X., Robertson H.A., Saul E.K., Nia L.V., Chan C.H., Chambers K.G., 2009, Combining morphometric and molecular approaches improves accuracy of sexing in the kakerori (*Pomarea dimidiata*) on Rarotonga, Cook Islands, *Notornis*, 56, 49-53.
343. Zhao D., McBride D., Nandi S., McQueen H.A., McGrew M.J., Hocking P.M., Lewis P.D., Sang H.M., Clinton M., 2010, Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken, *Nature*, 464, 237-242.

9. ПРИЛОЗИ

Прилог 1. Списак врста птица од којих је узорковано перје за анализу пола, број узорака, успешних и неуспешних анализа

Перје					
Ред	Врста	Успело	Неуспело	Недет.*	Укупно
Anseriformes	<i>Cygnus atratus</i>	14	4	0	18
	<i>Cygnus melancoryphus</i>	6	2	0	8
	<i>Branta canadensis</i>	0	0	6	6
	<i>Branta sandvicensis</i>	0	0	6	6
	<i>Alopochen aegyptiacus</i>	6	0	0	6
	<i>Cereopsis novaehollandiae</i>	4	0	0	4
	<i>Cygnus olor</i>	11	0	0	11
	<i>Anser canagica</i>	1	0	0	1
	<i>Anser fabalis</i>	1	0	0	1
	<i>Anser indicus</i>	0	0	2	2
	<i>Anser anser</i>	4	0	0	4
	<i>Chauna torquata</i>	4	0	0	4
Ciconiiformes	<i>Platalea leucorodia</i>	2	2	0	4
	<i>Ajaia ajaja</i>	2	1	0	3
	<i>Eudocimus ruber</i>	0	0	3	3
	<i>Leptoptilos crumeniferus</i>	3	0	0	3
	<i>Ciconia ciconia</i>	2	0	0	2
Falconiformes	<i>Neophron percnopterus</i>	6	1	0	7
	<i>Gyps fulvus</i>	13	3	0	16
	<i>Haliaeetus albicilla</i>	7	0	0	7
	<i>Milvus milvus</i>	2	0	0	2
	<i>Buteo buteo</i>	1	0	0	1
	<i>Falco subbuteo</i>	4	0	0	4
	<i>Aquila heliaca</i>	1	0	0	1
Coraciiformes	<i>Bucorvus leadbeateri</i>	10	0	0	10
Casuariiformes	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	0	0	5	5
	<i>Casuarius casuarius</i>	0	0	2	2
	<i>Rhea americana</i>	0	0	5	5
Columbiformes	<i>Ocyphaps lophotes</i>	2	0	0	2
	<i>Streptopelia decaocto</i>	2	0	0	2
	<i>Columba livia</i>	1	1	0	2

	<i>Columba arquatrix</i>	2	0	0	2
Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	16	2	0	18
	<i>Amazona leucocephala</i>	1	0	0	1
	<i>Amazona ochrocephala</i>	6	0	0	6
	<i>Amazona finchi</i>	1	0	0	1
	<i>Psittacus erithacus</i>	63	3	0	66
	<i>Ara ararauna</i>	41	4	0	45
	<i>Aratinga erythrogenys</i>	10	6	0	16
	<i>Amazona albifrons</i>	1	0	0	1
	<i>Cacatua sulphurea</i>	1	0	0	1
	<i>Amazona amazonica</i>	10	0	0	10
	<i>Cacatua moluccensis</i>	1	0	0	1
	<i>Cacatua alba</i>	5	0	0	5
	<i>Barnardius zonarius</i>	4	0	0	4
	<i>Trichoglossus haematodus</i>	4	0	0	4
	<i>Pyrrhura molinae</i>	2	0	0	2
	<i>Pionites melanocephala</i>	2	0	0	2
	<i>Ara chloroptera</i>	7	0	0	7
	<i>Aratinga acuticaudata</i>	3	0	0	3
	<i>Aprosmictus erythropterus</i>	4	0	0	4
	<i>Lorius lory</i>	8	0	0	8
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	1	0	0	1
	<i>Poicephalus senegalus</i>	1	0	0	1
	<i>Aratinga aurea</i>	1	0	0	1
	<i>Probosciger aterrimus</i>	3	0	0	3
	<i>Cacatua galerita</i>	3	0	0	3
	<i>Ara severa</i>	12	0	0	12
	<i>Aratinga jandaya</i>	3	0	0	3
<i>Coracopsis nigra</i>	2	0	0	2	
<i>Cyanoliseus patagonus</i>	2	0	0	2	
<i>Aratinga solstitialis</i>	4	1	0	5	
<i>Melopsittacus undulatus</i>	0	2	0	2	
Strigiformes	<i>Bubo bubo</i>	0	0	4	4
	<i>Tyto alba</i>	4	0	0	4
Passeriformes	<i>Corvus corax</i>	3	1	0	4
	<i>Lamprotornis superbus</i>	4	0	0	4
	<i>Corvus frugilegus</i>	2	0	0	2
	<i>Serinus canaria</i>	1	0	0	1
Gruiformes	<i>Balearica regulorum</i>	2	0	0	2
Cuculiformes	<i>Tauraco persa</i>	0	3	0	3
	<i>Tauraco hartlaubi</i>	2	0	0	2
Piciformes	<i>Ramphastos tucanus</i>	0	0	11	11
Galliformes	<i>Acryllium vulturinum</i>	9	0	0	9
	<i>Perdix perdix</i>	1	0	0	1
	<i>Coturnix coturnix</i>	1	0	0	1
	<i>Phasianus colchicus</i>	2	0	0	2
	<i>Guttera plumifera</i>	9	0	0	9

	<i>Gallus gallus</i>	5	0	0	5
Podicipediformes	<i>Podiceps cristatus</i>	1	0	0	1
Charadriiformes	<i>Scolopax rusticola</i>	1	0	0	1

*Недетерминисано

Прилог 2. Списак врста птица код којих је за анализу пола коришћена Таq ДНК полимераза, број узорака, успешних и неуспешних анализа

Протокол 1					
Ред	Врста	Успело	Неуспело	Недет.*	Укупно
Anseriformes	<i>Cygnus atratus</i>	8	3	0	11
	<i>Cygnus melancoryphus</i>	4	3	0	7
	<i>Branta canadensis</i>	0	2	4	6
	<i>Branta sandvicensis</i>	0	0	6	6
	<i>Alopochen aegyptiacus</i>	6	3	0	9
	<i>Cereopsis novaehollandiae</i>	4	0	0	4
	<i>Cygnus olor</i>	5	1	0	6
	<i>Anser indicus</i>	0	2	0	2
Ciconiiformes	<i>Platalea leucorodia</i>	4	1	0	5
	<i>Ajaia ajaja</i>	2	3	0	5
	<i>Eudocimus ruber</i>	0	0	3	3
	<i>Leptoptilos crumeniferus</i>	3	0	0	3
Falconiformes	<i>Neophron percnopterus</i>	3	1	0	4
	<i>Gyps fulvus</i>	3	0	0	3
	<i>Haliaeetus albicilla</i>	4	0	0	4
	<i>Milvus milvus</i>	2	0	0	2
Coraciiformes	<i>Bucorvus leadbeateri</i>	5	1	0	6
Casuariiformes	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	0	0	5	5
	<i>Casuarius casuarius</i>	0	1	0	1
	<i>Rhea americana</i>	0	3	3	6
Columbiformes	<i>Ocyphaps lophotes</i>	2	0	0	2
	<i>Columba arquatrix</i>	2	0	0	2
Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	2	2	0	4
	<i>Amazona leucocephala</i>	2	0	0	2
	<i>Psittacus erithacus</i>	22	12	0	34
	<i>Ara ararauna</i>	11	6	0	17
	<i>Cacatua sulphurea</i>	1	0	0	1
	<i>Amazona amazonica</i>	2	2	0	4
	<i>Cacatua moluccensis</i>	1	0	0	1
	<i>Cacatua alba</i>	1	0	0	1
	<i>Pionites melanocephala</i>	2	0	0	2
<i>Ara chloroptera</i>	2	0	0	2	

	<i>Aratinga acuticaudata</i>	5	9	0	14
	<i>Aprosmictus erythropterus</i>	3	1	0	4
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	8	1	0	9
	<i>Melopsittacus undulatus</i>	0	2	0	2
Strigiformes	<i>Bubo bubo</i>	0	3	0	3
Passeriformes	<i>Corvus corax</i>	4	3	0	7
Gruiformes	<i>Balearica regulorum</i>	2	1	0	3
Cuculiformes	<i>Tauraco persa</i>	0	2	0	2
Piciformes	<i>Ramphastos tucanus</i>	0	0	1	1

*Недетерминисано

Прилог 3. Списак врста птица код којих је за анализу пола коришћена модификована Таq ДНК полимеразе дизајнирана да буде отпорна на инхибиторе PCR

Протокол 2					
Ред	Врста	Успело	Неуспело	Недет.*	Укупно
Anseriformes	<i>Cygnus atratus</i>	5	2	0	7
	<i>Cygnus melancoryphus</i>	4	1	0	5
	<i>Branta canadensis</i>	0	0	0	0
	<i>Cereopsis novaehollandiae</i>	1	1	0	2
	<i>Cygnus olor</i>	7	0	0	7
	<i>Anser canagica</i>	1	0	0	1
	<i>Anser fabalis</i>	1	0	0	1
	<i>Anser anser</i>	5	0	0	5
	<i>Chauna torquata</i>	4	0	0	4
Ciconiiformes	<i>Ciconia ciconia</i>	2	0	0	2
Falconiformes	<i>Neophron percnopterus</i>	3	1	0	4
	<i>Gyps fulvus</i>	10	(28)*	0	38
	<i>Haliaeetus albicilla</i>	3	0	0	3
	<i>Milvus milvus</i>	2	0	0	2
	<i>Buteo buteo</i>	1	0	0	1
	<i>Falco subbuteo</i>	4	1	0	5
	<i>Aquila heliaca</i>	1	0	0	1
Coraciiformes	<i>Bucorvus leadbeateri</i>	4	0	0	4
Columbiformes	<i>Streptopelia decaocto</i>	2	0	0	2
	<i>Columba livia</i>	4	1	0	5
Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	14	0	0	14
	<i>Amazona leucocephala</i>	2	1	0	3
	<i>Amazona ochrocephala</i>	6	0	0	6
	<i>Amazona finchi</i>	1	0	0	1
	<i>Psittacus erithacus</i>	61	10	0	71
	<i>Ara ararauna</i>	41	7	0	48

	<i>Aratinga erythrogenys</i>	2	0	0	2
	<i>Amazona albifrons</i>	1	0	0	1
	<i>Amazona amazonica</i>	8	1	0	9
	<i>Cacatua moluccensis</i>	1	0	0	1
	<i>Cacatua alba</i>	6	0	0	6
	<i>Barnardius zonarius</i>	4	3	0	7
	<i>Trichoglossus haematodus</i>	4	0	0	4
	<i>Pyrrhura molinae</i>	2	0	0	2
	<i>Pionites melanocephala</i>	2	0	0	2
	<i>Ara chloroptera</i>	13	1	0	14
	<i>Aratinga acuticaudata</i>	8	9	0	17
	<i>Aprosmictus erythropterus</i>	4	0	0	4
	<i>Lorius lory</i>	8	0	0	8
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	1	1	0	2
	<i>Poicephalus senegalus</i>	1	0	0	1
	<i>Probosciger aterrimus</i>	3	0	0	3
	<i>Cacatua galerita</i>	3	0	0	3
	<i>Ara severa</i>	11	0	0	11
	<i>Aratinga jandaya</i>	3	0	0	3
	<i>Coracopsis nigra</i>	2	0	0	2
	<i>Cyanoliseus patagonus</i>	2	0	0	2
	<i>Aratinga solstitialis</i>	4	1	0	5
	<i>Eolophus roseicapilla</i>	4	0	0	4
Strigiformes	<i>Bubo bubo</i>	0	0	2	2
	<i>Tyto alba</i>	7	0	0	7
Passeriformes	<i>Lamprotornis superbus</i>	4	1	0	5
	<i>Corvus frugilegus</i>	2	0	0	2
Cuculiformes	<i>Tauraco persa</i>	1	0	0	1
	<i>Tauraco hartlaubi</i>	2	1	0	3
Piciformes	<i>Ramphastos tucanus</i>	0	2	10	12
Galliformes	<i>Acryllium vulturinum</i>	9	0	0	9
	<i>Perdix perdix</i>	2	0	0	2
	<i>Coturnix coturnix</i>	1	0	0	1
	<i>Phasianus colchicus</i>	2	0	0	2
	<i>Guttera plumifera</i>	9	1	0	10
	<i>Gallus gallus</i>	5	0	0	5
	<i>Meleagris gallopavo</i>	1	0	0	1
Podicipediformes	<i>Podiceps cristatus</i>	1	0	0	1
Charadriiformes	<i>Scolopax rusticola</i>	1	0	0	1

*Недетерминисано

БИОГРАФИЈА

Вучићевић Милош рођен је 17. јануара 1985. године у Београду, где је завршио основну и средњу школу. Студије ветеринарске медицине у Београду уписао је 2004. године, а дипломирао у новембру 2009. године, први у својој генерацији, са просечном оценом 9,38 (девет и 38/100). Од стране Универзитета у Београду додељена му је повеља за студента генерације. Исте године је уписао постдипломске студије на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Током постдипломских студија положио је све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 9,47 (девет и 47/100).

Пре избора за асистента за предмет Болести живине на Катедри за болести копитара, месоједа, живине и дивљачи Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, у новембру 2011. године, радио је на Катедри за биологију као истраживач сарадник у оквиру пројекта Министарства просвете и науке Републике и Србије “Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране” (руководилац проф. др Зоран Станимировић; ев. бр. 46002).

Захваљујући одличном успеху на студијама, био је добитник бројних стипендија. Стипендију Министарства просвете Републике Србије је примао у периоду 2005-2007 година, стипендију Фондације за развој научног и уметничког подмлатка у периоду 2007-2008 и 2009-2010, стипендију Фонда за младе таленте Републике Србије у периоду 2008-2009 год. У периоду од 2010. до 2011. године био је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Учествовао је на бројним симпозијумима и конференцијама. Стручних и научних чланака, укупно 17, публиковао је у домаћим и страним часописима. Од тог броја, четири рада је публиковао у часописима са SCI листе.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписани Вучићевић Милош

Број уписа:

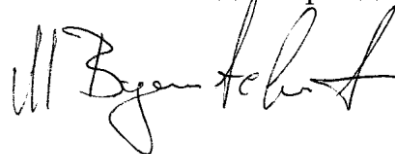
Изјављујем

Да је докторска дисертација под насловом „Анализа CHD гена птица као молекуларног маркера за детерминацију пола“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати конкретно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду,
2014. године

Потпис докторанда:



**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКОГ РАДА**

Име и Презиме аутора: Милош Вучићевић

Број уписа:

Студијски програм: докторске академске студије

Наслов рада: Анализа CHD гена птица као молекуларног маркера за детерминацију пола.

Ментор: Доц. др Јевросима Стевановић

Потписани Вучићевић Милош

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду,
2014. године

Потпис докторанда:



ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом „Анализа CHD гена птица као молекуларног маркера за детерминацију пола“, која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- 3. Ауторство - некомерцијално - без прераде**
4. Ауторство - некомерцијално -делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

У Београду,
2014. године

Потпис докторанда:

