Određivanje spola pomoću CHD gena kod porodice čaplji (Ardeidae)

Mihić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:824788

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Ivan Mihić

Određivanje spola pomoću *CHD* gena kod porodice čaplji (Ardeidae)

Diplomski rad

Osijek, 2105

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Određivanje spola pomoću CHD gena kod porodice čaplji (Ardeidae)

Ivan Mihić

Rad je izrađen: Zavod za zoologiju, Odjel za biologiju
Mentor: dr. sc. Alma Mikuška, doc.
Neposredni voditelj: dr. sc. Lidija Begović

Kratak sažetak diplomskog rada:

Spolni dimorfizam kod mladih jedinki čaplji nije izražen, te je jedna od pouzdanih metoda utvrđivanja spola mladih ptica putem molekularnih biljega. Cilj diplomskog rada je usporedba metoda za izolaciju DNA iz pera i ljuski jaja čaplji, te utvrđivanje spola prstenovanih jedinki čaplji. Rezultati pokazuju da je najveći prinos DNK dobiven iz pera koja su u razvoju (prokrvljena pera) i ljuski jaja. Prinos DNA je bio manji kad se koristio komercijalni kit za izolaciju u odnosu na izolaciju standardnim protokolom. Određen je spol deset prstenovanih čaplji na ribnjacima Jasinje. U dva gnijezda čaplje dangube (*Ardea purpurea*) utvrđeno je ukupno šest mužjaka (tri po gnijezdu), dok su u dva gnijezda velike bijele čaplje (*Ardea alba*) utvrđene četiri ženke, tri iz jednog i jedna iz drugog gnijezda. Ovo je prvo utvrđivanje spola čaplji putem *CHD* gena u Hrvatskoj. Opsežnijim višegodišnjim istraživanjima mogao bi se utvrditi odnos spolova u populaciji, stabilnost populacije, te poduzeti potrebne mjere zaštite gnijezdeće populacije čaplji u Hrvatskoj.

Broj stranica: 27
Broj slika: 10
Broj tablica: 2
Broj literaturnih navoda: 49
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: CHD gen, čaplje, Ardeidae, pera, ljuske jaja, određivanje spola,

Datum obrane: 28.09. 2015.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr.sc. Ljiljana Krstin, doc.
2. Dr.sc. Ivna Štolfa, doc.
3. Dr.sc. Alma Mikuška, doc.

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i na web stranici Odjela za biologiju

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer of Osijek **MS thesis**
Department of Biology
Graduate study programme in Biology
Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

Sex determination in herons (Ardeidae) using CHD gene

Ivan Mihić

Thesis performed at: Sub Department of Zoology, Department of Biology,

Supervisor: Alma Mikuška, PhD, assistant professor

Assistant in charge: dr. sc. Lidija Begović

Short abstract:

In sexually monomorphic species like herons one of the most reliable method of sex determination in young birds are molecular markers. The aim this work is a comparison of methods for the isolation of DNA from feathers and eggshells in herons, and sex determination of ringed young birds. Results showed that the highest yield of DNA was obtained from the young chick feathers, which are in development, and egg shells. The yield of DNA was lower when a commercial kit was used for isolation compared to the isolation with the standard protocol. Sex-typing was performed in ten ringed herons in the fishponds Jasinje. In two nests of purple heron (*Ardea purpurea*) a total of six males (three per nest) were found while in two nests of the great white egret (*Ardea alba*) we identified four females, three in one and one in another nest. This is the first time in Croatia that molecular approach was used for sex determination in herons by using *CHD* gene. More extensive research trough years would determine sex ratio in the population, population stability, and to lead to the necessary measures in order to protect nesting population of herons in Croatia.

Number of pages: 27
Number of figures: 10
Number of tables: 2
Number of references: 49
Original in: Croatian

Key words:, herrons, Ardeidae, feathers, egg shells, CHD gene, sex determination,

Date of the thesis defence: 28.09.2015.

Reviewers:

1. PhD Ljiljana Krstin, associate professor

2. PhD Ivna Štolfa, associate professor

3. PhD Alma Mikuška, associate professor

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and web page of Department of Biology.

Zahvaljujem se svojim mentoricama doc. dr. sc. Almi Mikuški i dr. sc. Lidiji Begović na savjetima, prenesenom znanju i vremenu uloženom u izradu ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem i dipl. bio. Tiboru Mikuški i Nenadu Šetini na prikupljenim materijalima potrebnima za izradu ovog rada.

Također se kolegama Kristini Kljajić i Robertu Grgacu na pomoći prilikom eksperimentalnog dijela rada.

Dodatno se zahvaljujem svojoj obitelji i kolegama koji su me podupirali tijekom cijelog studija i učinili studentske dane zanimljivijima.

Sadržaj

1.Uvod ... 1
1.1. Ekološka važnost močvara ... 1
1.2. Čaplje (Ardeidae) kao indikatori stanja močvarnih staništa ... 1
1.3. Opće značajke vrsta korištenih u istraživanju ... 2
1.3.1. Velika bijela čaplja (*Ardea alba* L.1758) ... 2
1.3.2. Siva čaplja (*Ardea cinerea* L.1758) ... 4
1.3.3. Čaplja danguba (*Ardea purpurea* L. 1766) ... 5
1.4. Monitoring porodice čaplji (Ardeidae) u Hrvatskoj ... 6
1.5. Metode utvrđivanja spola ptica ... 7
1.6. *CHD* gen ... 8
1.7. Cilj rada ... 9
2. Materijali i metode ... 10
2.1. Uzorkovanje pera i ljuski jajeta ... 10
2.2. Izolacija DNA ... 13
2.2.1. Standardni protokol za izolaciju DNA ... 14
2.2.2. Izolacija DNA pomoću DNAsy Blood and Tissue Kit (Qiagen) ... 14
2.3.Lančana reakcija polimerazom (PCR) i elektroforeza u gelu ... 15
3. Rezultati ... 16
3.1. Usporedba učinkovitosti dvaju protokola za izolaciju DNA ... 16
3.2. Usporedba količine i čistoće DNA dobivene iz različitih tkiva ... 17
4.3. Rezultati određivanja spola prstenovanih jedinki iz mješovite kolonije čaplji na ribnjacima Jasinje ... 18
4. Rasprava ... 20
5. Zaključci ... 23
6.Literatura ... 24

1.Uvod

1.1. Ekološka važnost močvara

Močvare su tijekom evolucije života na Zemlji poslužile kao inkubatori prvih kopnenih organizama. Zbog broja vrsta koje privlače kao staništa sa brojnim ekološkim nišama i tipovima staništa možemo reći da su močvare banke genetičke bioraznolikosti. Danas je više od 40% vrsta biljaka i životinja ekološki vezano za močvarna staništa (Westlake i sur., 1998; DZZP, 2005; Greb i sur., 2006). Močvare utječu i na okolna staništa jer mnoge vrste bakterija koje u njima žive pročišćuju vodu od toksina i zadržavaju nutrijente isprane sa poljoprivrednih površina, te usporavaju eutrofikaciju ostalih vodenih staništa (Kovačić i sur., 2000). S druge strane, uglavnom nisu pogodne površine za uzgoj ratarskih kultura potrebnih za prehranu rastuće ljudske populacije, te su kroz povijest isušivane i pretvarane u plodne obradive površine, čime su njihove površine značajno smanjene (Greb i sur., 2006). Nestajanjem močvara sve vrste biljaka i životinja vezane uz takva staništa postale su ugrožene (DZZP, 2005). Gotovo 7% površine Hrvatske su močvarna staništa (web 1). Međunarodna važnost zaštite močvarnih staništa potvrđena je 2. veljače 1971. godine kada je donesena Ramsarska konvencija koja štiti sva vlažna i vodena staništa u Svijetu (web 2). U Hrvatskoj su proglašena tri Ramsarska područja: Kopački rit na ušću Drave u Dunav, Lonjsko polje uz rijeku Savu, te delta Neretve u Dalmaciji (Radović i sur., 2005).

1.2. Čaplje (Ardeidae) kao indikatori stanja močvarnih staništa

Vrste iz porodice čaplji (Ardeidae) predstavljaju indikatore kvalitete vlažnih i močvarnih područja (Hancock i Kushlan, 1992). Glavni razlog zbog kojeg su gotovo sve vrste čaplji vezane za različita vodena staništa poput močvara, rijeka, poplavnih područja, obala mora i oceana, šuma mangrova itd. je njihov način ishrane. Čaplje su karnivorne ptice i hrane se organizmima koji žive u vodenim staništima kao što su vodozemaci, ribe, gmazovi, sitni sisavaci ili vodeni beskralježnjaci (Hanckok i Eliot, 1978). Većina vrsta čaplji su kolonijalne i društvene ptice koje svoje kolonije grade uz hranilišta. Život u koloniji im pruža zaštitu od predatora, ali i pronalazak kvalitetnijih hranilišta (Hanckok i Eliot, 1978). Osim toga, čaplje su zabilježene i na umjetnim jezercima, ribnjacima, rižinim poljima i drugim navodnjavanim područjima, na obalama akumulacija uz brane, melioracijskim kanalima ili poljoprivrednim

površinama što ukazuje na njihovu prilagodljivost životu na antropogenim staništima (Kushlan, 2007). Između ostalog, promjena kvalitete staništa na kojima se čaplje hrane, gnijezde, zimuju ili se odmaraju tijekom migracije, direktno utječe na veličinu i dugoročne trendove populacije (Hancock i sur., 1992). Istraživanja čaplji u drugoj polovici dvadesetog stoljeća su pokazala da mnogim vrstama i populacijama prijeti nestanak. Prema Kushlan (2007), zaključeno je da su čak četiri populacije potpuno izumrle, devet vrsta i 31 populacija su pod rizikom od izumiranja, dok su mnoge vrste na IUCN-ovoj crvenoj listi ugroženh životinja. Međunarodni ciljevi zaštite čaplji upravo svode na zaštitu staništa i lokaliteta, te gnijezdećih i preletnih populacija (Kushlan, 2007).

1.3. Opće značajke vrsta korištenih u istraživanju

Za istraživanje su odabrane tri vrste iz porodice čaplji (Ardeidae): velika bijela čaplja (*Ardea alba* L. 1758.), siva čaplja (*Ardea cinerea* L. 1758.) i čaplja danguba (*Ardea purpurea* L. 1766.). Prema sistematskom položaju sve tri vrste pripadaju rodu čaplji (Ardea) i podporodici dnevnih čaplji (Ardeinae). Dnevna aktivnost, dugo vitko tijelo i dugačak vrat su osnovne značajke potporodice (Ardeinae) (Kushlan, 2007). Kao i kod svih vrsta čaplji kod mladih ptića ne postoji spolni dimorfizam, dok je on izražen kod odraslih jedinki sivih i čaplji danguba. Odrasli mužjaci i ženke velikih bijelih čaplji se ne razlikuju izgledom (del Hoyo i sur., 1992). Sve tri vrste su kolonijalne gnjezdarice Hrvatske. Uzroci njihove ugroženosti su uglavnom vezani uz isušivanje staništa, nestanak tršćaka, te propadanje ribnjaka čime se smanjuje kvaliteta staništa. Jedan od razloga ugroženosti je i kemijsko onečišćenje voda zbog čega jedinke stradavaju uslijed akumulacije teških metala i pesticida u organizmu (Tutiš i sur., 2013).

1.3.1. Velika bijela čaplja (*Ardea alba* L.1758)

Vrsta veličine 80-104 cm, teška 700-1500g, raspona krila 140-170 cm. Perje je bijele boje kljun žute boje, a noge crne (slika 1). Kod vrste nema spolnog dimorfizma (del Hoyo i sur., 1992).



Slika 1. Velika bijela čaplja (*Ardea alba* L. 1758) (web 3).

Velika bijela čaplja je široko rasprostranjena u svijetu, nastanjuje jug Sjeverne Amerike, Južnu Ameriku, subsaharsku Afriku, južnu i jugoistočnu Aziju, Australiju te Europu. Palearktičke i Neoarktičke populacije su djelomično migratorne, dok tropske nisu. Populacije iz Europe zimi migriraju u Afriku i otočja uz atlantsku obalu Afrike. Gnijezdi se u jednovrsnim ili mješovitim kolonijama. Sezona gniježđenja ovisi o populaciji. Palearktička populacija gnijezdi u proljeće. Ženka snese 3-5 jaja. Inkubacija traje oko 25 dana. Ptići nakon 6-9 tjedana dobivaju perje i napuštaju gnijezdo (del Hoyo i sur., 1992). U Hrvatskoj nastanjuje poplavne doline Dunava, Save i Drave, te ima status redovite gnjezdarice, preletnice i zimovalice. Glavna zimovališta za zimujuće populacije velikih bijelih čaplji su upravo šaranski ribnjaci kontinentalne Hrvatske, Kopački rit i Lonjsko polje (Kralj i sur.,2013). Velika bijela čaplja ima status ugrožene vrste (EN) u Crvenoj knjizi ptica Hrvatske (Tutiš i sur., 2013), a u Svijetu prema IUCN-ovoj listi ima status najmanje zabrinjavajuće vrste (BirdLife Internaional, 2012a).

1.3.2. Siva čaplja (*Ardea cinerea* L.1758)

Sive čaplje su velike 90-98 cm, teške 1020-2073 g. i imaju raspon krila175-195 cm. Na glavi se ističe crna pruga koja počinje malo iznad očiju te se nastavlja u dugačka ukrasna pera na glavi (slika 2)



Slika 2. Siva čaplja (*Ardea cinerea* L. 1758) (web 4).

Perje na glavi vratu i s trbušne strane bijele je boje dok su leđa i krila sive boje. Kljun i noge kod odraslih jedinki koje su spremne za parenje je narančaste boje, dok je kod jedinki koje se nisu parile žuto-smeđe. Vrsta široko rasprostranjena na svim staništima s plitkom vodom. Nastanjuje Europu, Afriku (isključivši Saharu), te južnu i jugoistočnu i istočnu Aziju. Populacije koje žive u hladnijim podnebljima kao što su sjeverna i sjeveroistočna Europa te neke populacije s dalekog istoka migriraju tijekom zime. Populacije iz toplijih podnebljima su sjedilačke. Sezona parenja kod palearktičkih populacija traje od siječnja do svibnja. Gnijezde na plutajućoj vegetaciji ili na drveću u jednovrsnim ili mješovitim kolonijama s drugim

čapljama i bijelim žličarkama. Inkubacija jaja traje 25-26 dana. Ptići za 50 dana opernate te ostanu još 10-20 dana u gnijezdu (del Hoyo i sur., 1992). Siva čaplja je redovita gnjezdarica, preletnica i zimovalica u Hrvatskoj (Kralj i sur., 2013). U Crvenoj knjizi ptica Hrvatske ima status najmanje zabrinjavajuće (LC) vrste (Tutiš i sur., 2013). Isti status ima i na IUCN-ovoj listi ugroženih vrsta Svijeta (BirdLife Internaional 2012b).

1.3.3. Čaplja danguba (*Ardea purpurea* L. 1766)

Čaplje dangube su veličine 78-90 cm, a težine 525-1345g, dok im je raspona krila 120-150 cm. Karakterističan je kljun koji je nešto duži nego kod drugih vrsta čaplji, te dugačko ukrasno crno perje na glavi kod spolno zrelih jedinki.



Slika 3. Čaplja danguba (*Ardea purpurea* L 1766) (web 5).

Vrat i trbušna strana tijela su obojene crveno-smeđe, dok je perje na leđima i krilima sivo. Izuzev razlike u veličini ne postoji razlika između ženki i mužjaka u obojenosti perja (slika 3). Nastanjuje subsaharsku Afriku, deltu Nila, Madagaskar, Indiju, jugoistočnu Aziju, te dijelove Arabijskog poluotoka i Europe. Palearktičke populacije migriraju u Afriku tijekom zime.

Sezona gniježđenja kod zapadnih palearktičkih populacija traje od travnja do lipnja. Ženka snese 2-8 jaja. Inkubacija jaja traje 25-27 dana. Ptići ostaju u gnijezdu 45-50 dana dok ne opernate i ne prolete. Ptići imaju sivo perje s leđne strane, a bijelo s trbušne strane (del Hoyo i sur., 1992). Čaplje dangube su redovite gnjezdarice u nizinskom dijelu Hrvatske i Vranskom jezeru, te su preletnice i zimovalice (Kralj i sur.,2013). Imaju status ugrožene vrste (EN) u Crvenoj knjizi ptica Hrvatske (Tutiš i sur., 2013), a na IUCN-ovoj listi imaju status najmanje zabrinjavajuće vrste u Svijetu (BirdLife Internaional 2012c).

1.4. Monitoring porodice čaplji (Ardeidae) u Hrvatskoj

Monitoring čaplji u Hrvatskoj se provodi jer njihova populacija reflektira stanje okoliša, a promjene brojnosti u populaciji mogu pokazati uspjeh odnosno neuspjeh mjera zaštite močvarnih staništa (Mikuška i sur., 2012.). Redoviti monitoring kolonija sivih, velikih bijelih i čaplji danguba u Hrvatskoj se provodi od 1991. godine (Mikuska i sur., 2005; Horvat, 2011; Orkić, 2013). Gnijezdeća populacija sivih čaplji u Hrvatskoj procijenjena je na oko 2000-3000 parova (Kralj i sur.2013), a trend populacije ima eksponencijalni porast (Horvat, 2011). Gnijezdeća populacija čaplji danguba je procijenjena na 120-200 parova (Kralj i sur., 2013), s trendom koji je stabilan (Orkić, 2013). Gnijezdeća populacija velikih bijelih čaplji je procijenjena na oko 115-180 parova (Kralj i sur., 2013). U tijeku je izrada trenda gnijezdeće populacije velikih bijelih čaplji, kao i Akcijski plan zaštite za sve vrste čaplji koje gnijezde u Hrvatskoj (Mikuška A, *usmeno*). Jedna od osnovnih znanstvenih metoda istraživanja populacija ptica je prstenovanje, tako je u Hrvatskoj od početka prstenovanja prema Kralj i sur. (2013) ukupno prstenovano 4189 čaplji danguba, 1843 sive čaplje i 323 velike bijele čaplje. Čaplje se prstenuju mlade u gnijezdu, dok još nisu sposobne letjeti, i prilikom tog se uz morfometrijska obilježja mogu uzeti i uzorci tkiva za različite genetičke ili toksikološke analize.

1.5. Metode utvrđivanja spola ptica

Jedan od čimbenika zdravlja i opstanka svake populacije je odnos spolova, pa tako i populacija ugroženih vrsta kao što su čaplje (Chapman, 2012). Utvrđivanje spola kod ptica putem morfoloških obilježja je problematično, jer kod većine vrsta ne postoji izraženi spolni dimorfizam (Griffiths i sur., 1998). Kod mnogih vrsta ptica spol je nemoguće odrediti izvan sezone parenja (Donohue i Dufty, 2006), a kod mladih spolno nezrelih ptica koje nemaju svadbeno ruho, spol je teško odrediti (Griffiths i Tiwari, 1993; Fridolfsson i Ellegren, 1999).
Spol ptica može se odrediti na osnovi: (1) ponašanja tijekom parenja, (2) pojave ogoljene kože kod sjedenja na jajima, (3) razlikama u morfometrijskim osobinama, (4) pregledavanje spolnih žlijezda laparotomijom ili laparoskopijom te (5) određivanjem spolnih kromosoma. Prve dvije metode su prilično jednostavne, ali moguće samo u ograničenom razdoblju, tijekom sezone parenja. Pojava ogoljene kože kod sjedenja na jajima, također, se ne javlja kod svih vrsta ptica. Kod morfometrijskih mjerenja se često parametri preklapaju te daju dvojbene rezultate. Laparotomija je kiruška metoda gdje se napravi rez na abdominalnoj šupljini ptica da bi se došlo do spolnih žlijezda, dok je laparoskopija umetanja optičkog vlakna u abdominalnu šupljinu (web 6). Ove metode osim što su izrazito invazivne, nisu uspješne van sezone parenja jer se gonade smanje i nisu više lako uočljive (Dubiec i Zagalska-Neubauer, 2005).
Ptice, kao i sisavci, imaju različite spolne kromosome ovisno o spolu. Za razliku od sisavaca kod ptica spol određuju Z i W kromosom. (Ohno, 1967) Ženke su heterozigoti i imaju genotip ZW, dok su mužjaci homozigoti i imaju genotip ZZ. W i Z kromosomi su nastali evolucijom iz para autosoma i s vremenom su se diferencirali u spolne kromosome.

Z kromosom spada u grupu velikih kromosoma i tIjekom evolucije je ostao visoko konzerviran, a W kromosom je mali jer je tijekom evolucije izgubio gene. Zbog različitog izgleda ovi kromosomi su pogodni za citološko određivanje spola (Fridolffson i sur., 1998). Da bi se kromosomi mogli pregledati potrebno je uzgojiti kulturu stanica te zaustaviti njihov ciklus u metafazi. Stanice se nakon toga pregledavaju pod mikroskopom. Stanice se obično dobiju iz srži rastućih pera. Spolne kromosome je lako prepoznati zbog razlike u veličini. Ova metoda, iako neinvazivna i pouzdana, zahtijeva dosta truda, iskustva i vremena da bi se dobio dobar razmaz na kojem se mogu pregledati kromosomi (Dubiec i Zagalska-Neubauer, 2005).

Osim citoloških postoje i različite molekularne metode određivanja spola iz DNA koje se temelje na različitim sekvencama Z i W kromosoma. Najjednostavnija i najučinkovitija je metoda određivanja spola pomoću CHD gena.

1.6. *CHD* gen

CHD (chromo-helicase-DNA binding gene) gen je gen koji ima ulogu u kontroli transkripcije na kromatinskoj razini te utječe na kondenzaciju kromatina, stoga je vrlo konzerviran kod svih vrsta ptica. Nalazimo ga u dvije varijante: mužjaci imaju *CHD-Z* gen koji je vezan za Z kromosom koji je manje podložan mutacijama dok ženke uz *CHD-Z* gen imaju i *CHD-W* gen koji se nalazi na W kromosomu i podložniji je mutacijama (Friddolffson i Ellegren, 1999; Griffiths i sur., 1998). Unatoč tome sama CHD kodirajuća DNA je visoko konzervirana u obje varijante te se nakon PCR reakcije i elektroforeze ne može razlikovati na gelu jer su dobiveni odsječci DNA jednake duljine te se vrpce na gelu preklapaju. Ne kodirajuća intronska regija DNA je, međutim, podložnija mutacijama te je kod *CHD-W* gena kraća, stoga je razvijena metoda koja istodobno umnaža oba *CHD* gena uz pomoć početnica DNA komplementarnim intronskoj regiji. Na ovome principu je razvijena izrazito precizna, a opet jednostavna, metoda određivanja spola, gdje se nakon PCR reakcije i elektroforeze dobije jedna pruga ukoliko se radi o mužjacima, a dvije pruge kod DNA ženki (Friddolffson i Ellegren, 1999). Zbog visoke konzerviranosti *CHD* gena metoda se može primijeniti na sve ptice osim bezgrebenki (*Paleognathae*) kod kojih nema morfološke razlike između W i Z gena, a time ni *CHD* gena (Ansari i sur., 1988).

1.7. Cilj rada

Cilj diplomskog rada je utvrditi primjenjivost molekularnog određivanja spola kod čaplji pomoću *CHD* gena.

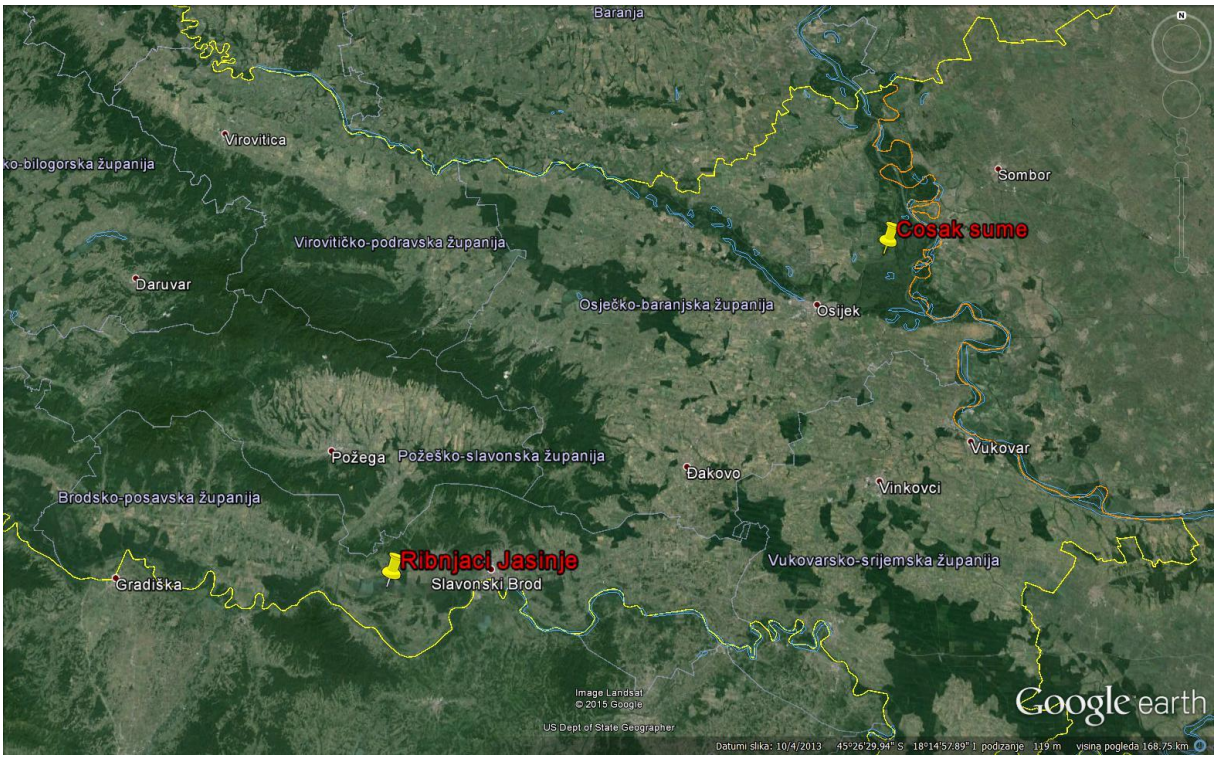
Specifični ciljevi ovog rada:

1. Usporediti dvije metode izolacije DNA i izabrati prikladniju metodu za određivanje spola čaplji obzirom na količinu i čistoću DNA.
2. Usporediti rezultate količine i kvalitete DNA nakon izolacije iz pera i ljuske jaja.
3. Utvrditi odnos spolova kod prstenovanih jedinki gnijezdećih populacija iz porodice čaplji (Ardeidae).

2. Materijali i metode

2.1. Uzorkovanje pera i ljuski jajeta

Konturna pera i ljuske jaja sivih čaplji uzorkovani su u gnijezdećoj koloniji na lokalitetu Ćošak šume u Parku prirode Kopački rit (slika 4). Kopački rit je poplavno područje nastalo djelovanjem dviju velikih rijeka, Dunava i Drave. Na području Parka prirode zabilježeno je 297 vrsta ptica od kojih su 140 vrsta gnjezdarice. Posebno je bogata ornitofauna ptica močvarica (Benčina i sur., 2011). Mlada pera velikih bijelih čaplji i čaplji danguba uzorkovani su na ribnjacima Jasinje u Jelas polju. Jelas polje predstavlja najistočniju od niza poplavnih nizina smještenih između sjeverne obalu rijeke Save (slika 4). U Jelas polju se nalazi jedan od najvećih kompleksa ribnjaka koji su se nekada koristili za ekstenzivan uzgoj ribe (web 7). Na ribnjacima Jasinje zabilježeno je više od 230 vrsta ptica od kojih su 122 vrste gnjezdarica. Posebna značajka ovih ribnjaka je u tome što ovdje gnijezdi najveća mješovita kolonija žličarki i čaplji (*Ardea sp.*) u Hrvatskoj (Fontana-Pudić, 2010).



Slika 4. Lokaliteti Ćošak šume i ribnjaci Jelas na kojima su smještene kolonije čaplji od kojih su uzorkovana pera i ljuske za izolaciju DNA i determinaciju spola. (Google Earth 2015).

Uzorkovanje pera i ljuski jaja sivih čaplji obavljeno je tijekom travnja 2015 nakon sezone gniježđenja. Obzirom da sive čaplje u koloniji Ćošak šume gnijezde na jasenima i hrastovima, uzorci su prikupljeni na tlu ispod gnijezda. Mlada pera velikih bijelih i čaplji danguba uzorkovana su tijekom redovitog prstenovanja mješovite kolonije čaplji i žličarki u lipnju 2015 na ribnjacima Jelas (slike 4 i 5). Čaplje na ribnjacima Jelas gnijezde u trsci na plutajućoj vegetaciji, tako da su pera uzorkovana čupanjem s ptića. U kolonijama koje su na plutajućoj vegetaciji poput kolonije na ribnjacima Jelas, ptići se prstenuju prije nego nauče letjeti, a nakon što su dovoljno odrasli da ih prstenovanje ne ozljeđuje i uznemirava (Kušlan, 2007). Prstenovanje i uzorkovanje obavili su Nenad Šetina i Tibor Mikuška, ovlašteni prstenovači iz Hrvatskog društva za zaštitu ptica i prirode. Nakon terenskog uzorkovanja, pera i ljuske su pohranjene na sobnoj temperaturi i dalje analizirane u laboratoriju.

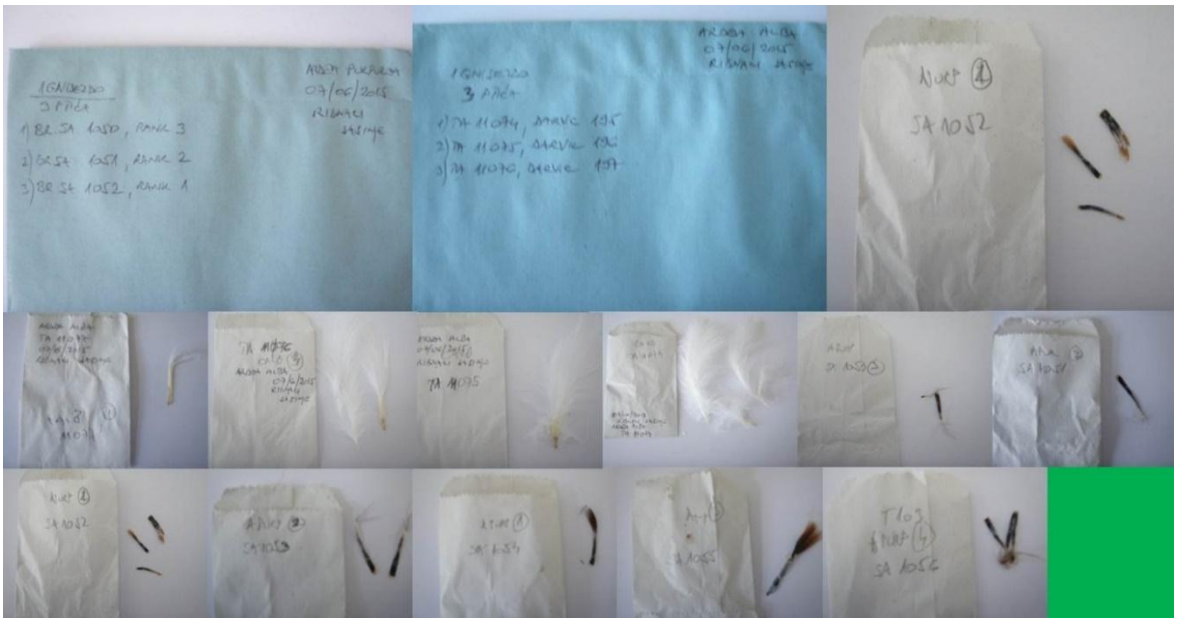


Slika 4. Prstenovanje mladih ptića velike bijele čaplje i čaplje dangube na ribnjacima Jelas 2015. godine. (foto N.Šetina)



Slika 5. Mladi ptići velike bijele čaplje na ribnjacima Jelas 2015. godine (foto T. Mikuška).

U velike plave omotnice su spremljena pera iz istog gnijezda s oznakama prstenovanih jedinki prema serijskom broju prstena, osobe koja je prstenovala i uzorkovala pero i datumom uzorkovanja. Pera s iste jedinke su stavljena u manje papirne vrećice s oznakom serijskog broja prstena. Sva pera iz istog gnijezda su stavljena u jednu papirnu omotnicu (slika 6).



Slika 6. Uzorkovana pera, način označavanja i spremanja (foto. L.Begović).

Za usporedbu dvije metode za izolaciju DNA korištena su konturna pera odraslih jedinki bijele čaplje (*Ardea alba* L. 1758.), te konturna pera i ljuske jaja sive čaplje (*Ardea cinerea*). Spol jedinki iz mješovite kolonije čaplji na ribnjacima Jelas određen je iz pera mladih ptića velikih bijelih čaplji (*Ardea alba*) i čaplji danguba (*Ardea purpurea*).

2.2. Izolacija DNA

U laboratoriju je baza pera svake jedinke, koja je sadržavala krvni ugrušak, odrezana sterilnim žiletom te usitnjena na komadiće duljine oko 2 mm i prebačena u plastičnu tubicu od 1,5 mL (slika 7). Ljuske od jaja su prikupljene iz kolonija čaplji od već izleženih ptića. Za izolaciju DNA odrezano je nekoliko komadića unutarnje ovojnice (po mogućnosti s krvnim žilicama) nakon čega su usitnjeni na komadiće veličine 1-2 mm i prebačeni u tubice od 1,5 mL.
DNA je izolirana na dva načina: koristeći standardni protokol za izolaciju prema De Volo i sur. (2008) uz određene modifikacije te prema protokolu proizvođača za izolaciju pomoću DNAsy Blood and Tissue Kit (Qiagen).



Slika 7. Rad u laboratoriju, priprema pera za izolaciju DNA iz tkiva (foto A. Mikuška).

2.2.1. Standardni protokol za izolaciju DNA

Za izolaciju DNA prema De Volo i sur. (2008) korišteno 600 µL TNE pufera (Tris-NaCl-EDTA, pH=7,4) 40 µL proteinaze K (20 mg/mL početna koncentracija) i 16 µL 1M (početna koncentracija) ditiotreitola (DTT). Uzorci su ostavljeni na digestiji preko noći na temperaturi od 56°C. Sutradan uzorci su centrifugirani na 13 000 *g* 5 minuta (sva centrifugiranja u ovom postupku su izvođena su na 4°C). U prvom koraku dodano je 300 µL 3M natrijevog acetata, smjesa je dobro izmiješana na vibracijskoj miješalici i zatim stavljena 5 min na inkubaciju na ledu. Potom su uzorci centrifugirani 10 minuta na 16 000 *g* nakon čega je supernatant prebačen u novu sterilnu tubicu i u njega je dodan prethodno ohlađeni izopropanol u omjeru 1:1 (v/v) za precipitaciju DNA. Smjesa je potom stavljena na inkubaciju 30 min na -20°C. Nakon inkubacije smjesa je ponovo centrifugirana 10 min na 16 000 *g*, potom je supernatant bačen, a talog ispran s 1 mL hladnog 70% etanola, dobivena otopina centrifugirana 1 minutu na 16 000 *g* supernatant je opet bačen a talog ostavljen na sušenje na zraku, DNA je otopljena u 40 µL sterilne redestilirane vode i spremljena na -20°C.

2.2.2. Izolacija DNA pomoću DNAsy Blood and Tissue Kit (Qiagen)

Uzorci su prvo pripremljeni na isti način kao i za izolaciju DNA standardnim protokolom. Da bi se razgradilo tkivo pera dodano je 360 µL ATL pufera, 40 µL proteinaze K(20 mg/ml) te 16 µL 1M DTT te su uzorci ostavljeni na digestiji preko noći na temperaturi 56°C. Sutradan je DNA izolirana i pročišćena. Prvo je u uzorke dodano po 400 µL AL pufera a zatim je smjesa dobro izmiješana na miješalici i stavljena na inkubaciju 10 minuta na 70°C. Nakon toga je dodano 400 µL 96% etanola te je smjesa opet dobro izmiješana na vibracijskoj miješalici te stavljena kratko na centrifugiranje pri 6000 *g* (sva centrifugiranja su izvedena na sobnoj temperaturi). Supernatant je zatim prebačen u novu čistu kolonu (dobivenu s kitom) na način da se dodaje po 600 µL supernatanta, centrifugira 1 min pri 6000 *g*, baci sve što je prošlo kroz kolonu i postupak ponovi dok se ne iskoristi sav supernatant iz prethodnog koraka. U slijedećem koraku na kolonu se dodaje 500 µL AW1 pufera, a zatim se opet centrifugira na 6000 *g* 1 min i baci tekućina koja prođe kroz kolonu. Nakon čega se doda 500 µL AW2 pufera te se smjesa centrifugira na 20 000 *g* 3 min i baci se sva tekućina koja prođe. Kolonu je prebačena u čistu tubicu od 1,5 mL te je dodano dva puta po 20 µL AE pufera direktno na kolonu za eluaciju DNA. Koncentracija DNA u uzorcima izmjerena je spektrofotometrijski pomoću NanoPhotometer (Implen GmBH).

2.3.Lančana reakcija polimerazom (PCR) i elektroforeza u gelu

Odsječci CHD gena su umnažani pomoću para početnica 2550F (5'- GTTACTGAT TCGTCTACGAGA-3') i 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') (Fridolfsson i sur., 1999). U lančanu reakciju polimerazom (PCR) stavljeno je po 10 μL 2x TaKaRa Emerald Mix (Clontech) koji (sadrži optimizirani pufer, polimerazu, smjesu dNTP-ova (dinukleotid tri fosfata), magnezij i boju (web 12), po 2 μM svake početnice i 50 ng DNA. Volumen ukupne smjese iznosio je 20 μL. Uvjeti PCR reakcije su bili: početna denaturacija na 94°C 5 minuta nakon čega je slijedilo 40 ciklusa denaturacije na 94°C 30 sekundi, sparivanje početnica (annealing) na 55°C 1 min, produživanje lanaca 2 min na 72°C te završno produljivanje lanca na 72°C u trajanju od 7 min.

Nakon PCR reakcije uzorci su naneseni na prethodno pripremljeni 2% agarozni u TAE puferu (Tris-acetat EDTA, pH=8,0). Za određivanje veličine DNA odsječaka korišten je 50 kb DNA marker (Sigma). Gel je obojan bojom SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) u omjeru 1:10 000. Elektroforeza se provodila na 100 V, 30-60 minuta. Nakon elektroforeze DNA odsječci su vizualizirani pomoću UV transiluminatora i fotografirani i obrađeni koristeći Kodak 1D 3.6 program (Kodak).

3. Rezultati

3.1. Usporedba učinkovitosti dvaju protokola za izolaciju DNA

Tijekom ovog eksperimenta korištene su dvije metode izolacije DNA te je uspoređena količina dobivene DNA. Kao izvor DNA korištena su pera odraslih ptica i ptića te ljuske jaja.

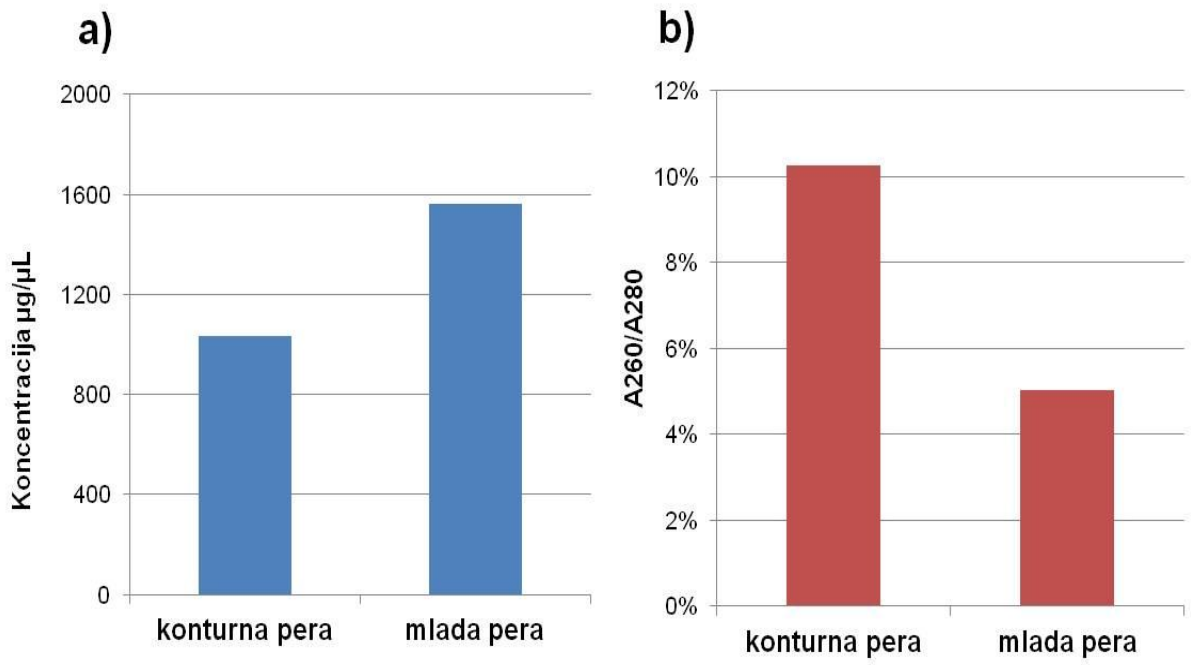
Tablica 1. Usporedba koncentracije (iskazane koncentracijom DNA) i čistoće uzoraka DNA (260 nm/280nm) dobivenih dvjema metodama na primjeru sive čaplje (*Ardea cinerea*).

Oznaka uzorka	**Tkivo**	**Metoda**	**Koncentracija (µg/µL)**	**čistoća DNA 260/ 280 nm**
J 1	Ljuska jaja	Qiagen	99,5	1,793
J 1	Ljuska jaja	De Volo	416	1,822
J 2	Ljuska jaja	Qiagen	24	1,5
J 2	Ljuska jaja	De Volo	473	1,855
P 1	Pero	Qiagen	-	-
P 1	Pero	De Volo	21,5	1,792
P 2	Pero	Qiagen	220	2,095
P 2	Pero	De Volo	2780	2,007

Količina dobivene DNA je iskazana kroz koncentraciju, dok je omjer absorbancije 260/280 nm pokazatelj čistoće DNA pri čemu se vrijednost od oko 1,8 smatra čistom DNA (web 2). Vidljivo je da su uzorci gdje je DNA izolirana prema standardnom protokolu (DeVolo i sur., 2008.) imali veću količinu DNA (tablica 1) stoga je ova metoda izolacije korištena za izolaciju DNA i određivanju spola prstenovanih jedinki. Također, rezultati pokazuju da metoda izolacije nema znatan utjecaj na čistoću DNA. Gotovo svi uzorci su dali relativno dobru čistoću DNA osim uzorka J2 rađenom prema kitu (Qiagen) gdje je čistoća bila nešto lošija, no vidimo da je i koncentracija DNA u ovom uzorku bila mala, dok u uzorku P1, također rađenim kitom, nije izolirana dovoljna količina DNA koja bi se mogla očitati na korištenom uređaju.

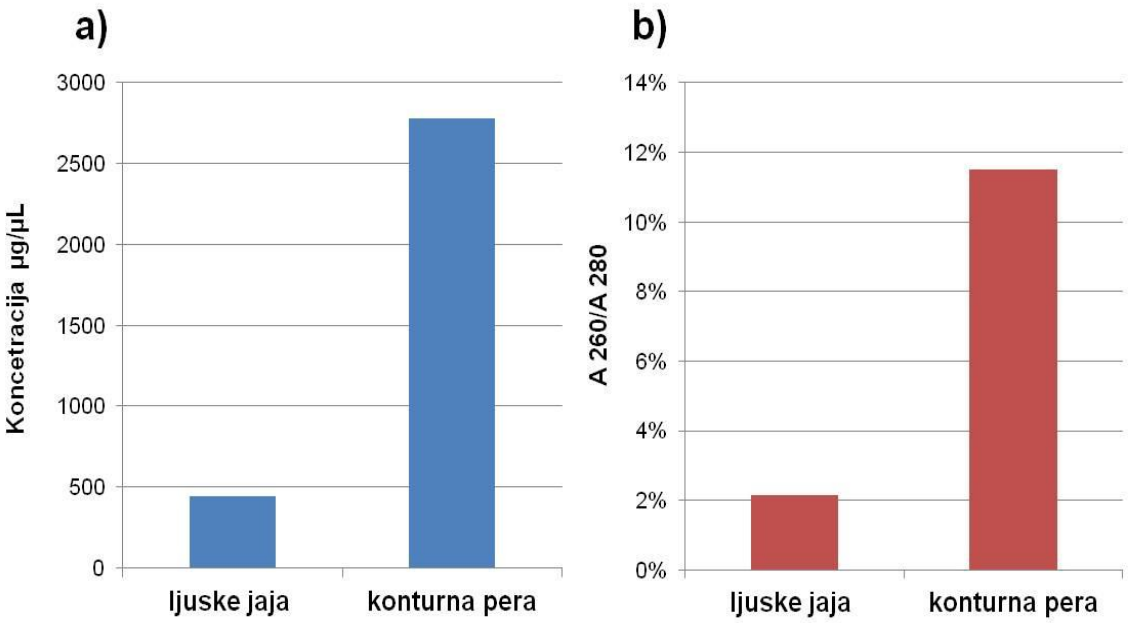
3.2. Usporedba količine i čistoće DNA dobivene iz različitih tkiva

Uspoređujući količinu DNA dobivenu nakon izolacije standardnim protokolom vidljivo je da su mlada pera ptića imala u prosijeku veću koncentraciju DNA, a čistoća DNA je bila zanemarivo bolja (slika 8).



Slika 8.a) Usporedba količine DNA dobivene iz konturnih pera odraslih jedinki i mladih pera ptića nakon izolacije standardnim protokolom. b) Usporedba odstupanja vrijednosti čistoće DNA dobivene omjerom absorbancije na 260 / 280nm od vrijednosti 1,8 izražena u postotcima.

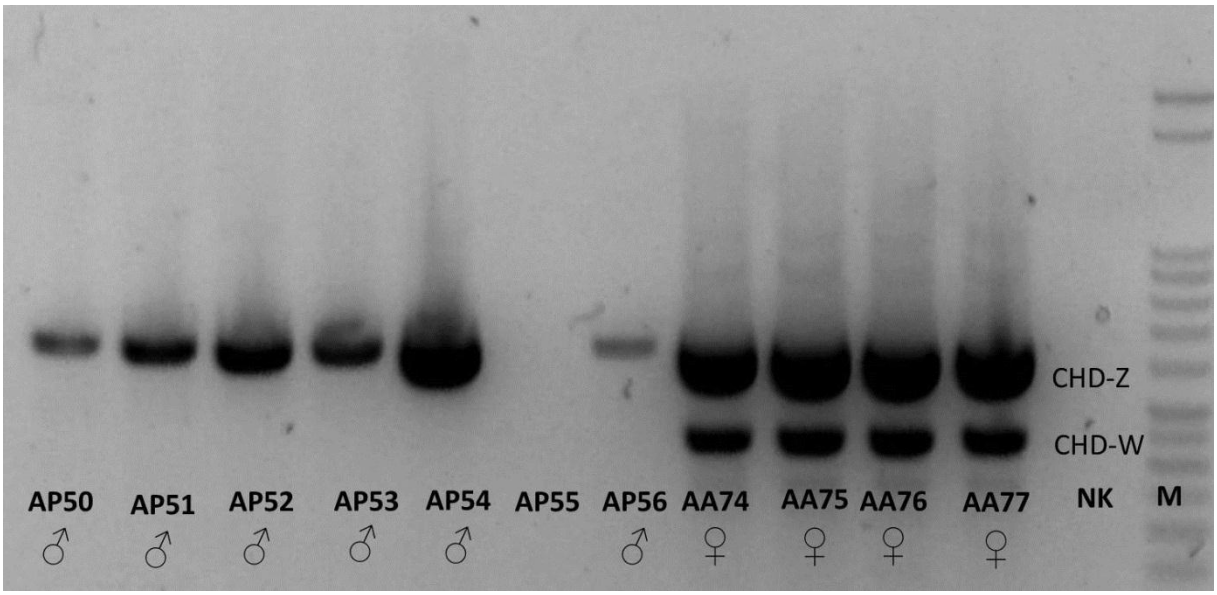
Kada usporedimo DNA dobivenu iz jaja i pera (slika 9) vidimo da je veća količina DNA dobivena iz pera u usporedbi s količinom DNA dobivenom iz ljuske jaja, no iz ljuske jaja je dobivena DNA bolje čistoće.



Slika 9. a) Usporedba srednjih vrijednosti koncentracije DNA dobivene iz ljuski jaja i konturnih pera nakon izolacije standardnim protokolom na primjeru sive čaplje (*Ardea cinerea*) b) Usporedba odstupanja vrijednosti čistoće DNA dobivene omjerom absorbancije 260/280 nm od vrijednosti 1,8 prikazana u postotcima, na primjeru sive čaplje (*Ardea cinerea*).

4.3. Rezultati određivanja spola prstenovanih jedinki iz mješovite kolonije čaplji na ribnjacima Jasinje

U mješovitoj koloniji čaplji i žličarki na ribnjacima Jelas prstenovano je jedanaest ptića u četiri gnijezda. Spol je određen kod ukupno deset ptića. Rezultati molekularnog određivanja spola pomoću *CHD* gena pokazuju da se u prvom gnijezdu velikih bijelih čaplji nalaze tri ptića ženskog spola (oznake: AA74, AA75, AA76), dok se u drugom gnijezdu nalazi jedan ptić ženskog spola (oznaka: AA77). Sedam prstenovanih ptića su čaplje dangube (*Ardea purpurea*, oznaka AP) Šest ptića su mužjaci a ptiću s oznakom AP55 nije uspješno određen spol. Oznake jedinki sadrže inicijale latinskog imena vrste, te zadnje dvije znamenke serijskog broja pripadajućeg prstena (slika 10, tablica 2).



Slika 10. Rezultati određivanja spola prstenovanih jedinki mješovite kolonije čaplji na ribnjacima Jasinje, Oznake predstavljaju inicijale latinskog imena vrsta: AA (*Ardea alba*) i AP (*Ardea purpurea*) te zadnje dvije znamenke serijskog broja prstena, uz oznake jedinki pridružen je i spol jedinki kod kojih je utvrđen. Kratica NK označava negativnu kontrolu, a kratica M molekularni marker za veličinu PCR produkata.

Tablica 2. Rezultati određivanja spola ptića iz mješovite kolonije ribnjaci Jasinje.

Vrsta	Gnijezdo	Serijski broj prstena	Oznaka uzorka	Spol
Ardea purpurea	1	1050	AP50	mužjak
Ardea purpurea	1	1051	AP51	mužjak
Ardea purpurea	1	1052	AP52	mužjak
Ardea purpurea	2	1053	AP53	mužjak
Ardea purpurea	2	1054	AP54	mužjak
Ardea purpurea	2	1055	AP55	nepoznat
Ardea purpurea	2	1056	AP56	mužjak
Ardea alba	1	11074	AA74	ženka
Ardea alba	1	11074	AA75	ženka
Ardea alba	1	11074	AA76	ženka
Ardea alba	2	11074	AA77	ženka

4. Rasprava

Kod većine vrsta ptica ne postoji spolni dimorfizam, stoga je pouzdano određivanje spola bilo vrlo teško i zahtijevalo je dugogodišnje iskustvo u promatranju određene vrste. Kod mladih ptica, spol je gotovo nemoguće odrediti bez molekularnih metoda pomoću *CHD* gena (Dubiec i Zagalska- Neubauer, 2005).

Tkiva koja se koriste pri takvom postupku su najčešće krv ili pera ptica koja pri osnovi badrljice sadržavaju kapljicu krvi. U ovom istraživanju korištena su pera jer je postupak brz manje invazivan, i manje stresan za pticu te nije potrebna prisutnost stručnjaka. Koriste se isključivo konturna pera koja nisu ključna za let i navigaciju u letu. Nedostatak je što DNA dobivene iz perja ima puno manje nego one dobivene iz krvi (Dolenec i Šinko, 2009). Ponekad se čak koriste i već odbačena pera ili ljuske već izleženih jaja te se životinja ne mora uopće uznemiravati (Hogan i sur., 2007). Zbog usmjeravanja istraživanja na određenu prstenovanu populaciju, korištena su svježe počupana pera jer se ona mogu povezati sa jedinkom kojoj pripadaju, što nije slučaj sa odbačenim perima i ljuskama jajeta

Za preliminarna istraživanja korištena su pera odraslih jedinki, dok su za određivanje spola kolonije na ribnjacima Jasinje korištena pera mladih ptica. Trebalo bi napomenuti da su konturna pera bila u nešto lošijem stanju nego svježe počupana mlada pera što je vjerojatno utjecalo na količinu izolirane DNA (Hogan i sur., 2007) pa je kod mladih pera dobiveno više DNA (slika 8a), dok je čistoća DNA je zanemarivo bolja nego kod izolacije iz konturnih pera (slika 8b). Pero koje raste je dobro prokrvljeno jer se stanice stalno rastu i dijele se, stoga im je potreban kisik i hranjive tvari kojima ih opskrbljuje krv, no kada se pero u potpunosti razvije ono postane neživo tkivo i više nije prokrvljeno (kao i dlaka sisavaca) te nakon što se ošteti otpada i zamjenjuje ga novo. Mlade ptice imaju više nerazvijenih pera jer je njihov pernati pokrov nekoliko puta mijenja dok odrastaju, dok odrasle ptice uglavnom samo zamjenjuju poneko oštećeno pero, izuzev razdoblja nakon parenja ili tijekom sezonskog mitarenja (Gill, 2006).

Uz perje su korištene i ljuske izleženih jaja. Uz vanjsku ljusku jajeta nalaze se još 2 albuminske ovojnice: vanjska i unutarnja koje služe kao obrana fetusa od vanjskih parazita, također omogućuju izmjenu kisika i CO_2 kako bi fetus mogao disati dok je u jajetu, stoga s razvojem ptića u ove ovojnice počinju urastati kapilare. Nakon izlijeganja vanjska albuminska ovojnica ostane uz ljusku jajeta, a s njome i ostatci kapilara koji mogu poslužiti kao izvor DNA (Gill, 2006). Upravo se zato mogu koristiti i za određivanje spola ptića kao što je bio

slučaj u ovom istraživanju. Uspoređujući dobivene rezultate (slika 9) vidljivo je da je iz ljuski jajeta u odnosu na perje dobiveno manje DNA, ali je dobivena DNA bila nešto bolje čistoće. Očekivali bi smo da se iz ljuske jajeta može dobiti veća količina DNA nego iz badrljice perja (Trimbos i sur, 2009.), no dobiveni rezultati govore suprotno. Mogući razlog tome bi bio što je tkivo u peru je zatvoreno u badrljici dok je tkivo s ljuske jajeta na otvorenom, stoga je podložnije degradaciji. Ipak dobivena količina DNA je dovoljna te se može koristiti za određivanje spola jedinke, no zbog cilja našeg istraživanja ljuske jaja nisu korištene za određivanje spola ptića na ribnjacima Jasinje, jer ih je kao i odbačena pera teže povezati s određenom jedinkom, odnosno serijskim brojem prstena te jedinke.

U preliminarnim istraživanjima su korištene i dvije metode izolacije DNA: 1. prema protokolu za izolaciju DNA pomoću DNAsy Blood and Tissue Kita (Qiagen) i 2. prema standardnom protokolu za izolaciju DNA prema De Volo, 2008. Standardni protokol se svakako pokazao boljim jer su dobivene količine DNA bile puno veće, dok je razlika u čistoći dobivene DNA bila zanemariva (tablica 1). Prilikom izolacije koristeći Qiagen kit, događalo se da se filteri na kolonama za izolaciju začepe što je svakako utjecalo na količinu DNA dobivene nakon izolacije. Kit je vjerojatno pogodniji za izolaciju DNA iz mekših tkiva kao što je krv, dok bi se čvršće strukture kao što je keratin u perju teško razgrađuje. Moguće je da bi se povećanjem količine proteinaze K prilikom digestije riješio ovaj problem ili bi bilo uputno produžiti vrijeme digestije da bi se uzorci bolje razgradili, svakako bi bilo dobro koristiti više kolona po uzorku prilikom izolacije DNA.

Huang i sur., (2012) uspješno su odredili spol jedinki iz porodice čaplji iz krvi i izmeta koristeći posebno dizajnirane početnice (Wang i sur., 2011). Korištene početnice,u ovom radu 2550F i 2718R (Fridolffson i Ellergren, 1999.) pokazale kao vrlo dobre za *CHD* geni čaplji. Prema istraživanju Dolenec i Šinko (2009) mogu se koristiti za sve vrste ptica osim vrapčarki (*Passeriformes*) te naravno bezgrebenki (*Paleognathae*) koje nemaju diferencirane *CHD* gene pa ova metoda općenito nije upotrebljiva.

Na ribnjacima Jasinje, u mješovitoj koloniji čaplji prstenovano je jedanaest ptića iz četiri gnijezda. Četiri ptića velike bijele čaplje (*Ardea alba*) i sedam ptića čaplje dangube (*Ardea purpurea*). Uspješno je određen spol kod deset ptića. Ptiću s oznakom AA55 iz nepoznatih razloga nije uspješno određen spol, uzrok je vjerojatno premala količina ili lošija čistoća DNA što je utjecalo na proces amplifikacije u PCR reakciji. Ponavljanjem PCR reakcije koristeći produkte prethodne PCR reakcije kao DNA kalup moglo bi utjecati na uspješnost određivanja spola. Svi ptići velikih bijelih čaplji su bili ženke, a ptići čaplje dangube mužjaci. Ovi rezultati svakako ne odgovaraju Mendellevom načelu nasljeđivanja,

prema kojemu bi vjerojatnost nasljeđivanja nekog spola trebala biti 50%. U prirodi je odnos spolova u populaciji rijetko 1:1, kod sisavaca kako jedinke stare u jednoj generaciji se ravnoteža pomiče u korist ženki, dok je kod ptica obrnuto, ravnoteža se pomiče u korist mužjaka (Donald, 2007). Također kod svih ptica pa tako i čaplji spol je određen genetički, a ne vanjskim faktorima kao što je temperatura, tako da se taj uzrok dobivenog rezultata može isključiti (Chue i Smith, 2010). Charles Darwin je smatrao da se odnos spolova u populaciji mijenja s promjenama u okolišu, možemo reći da je i to jedan način evolucije u populaciji (Donald, 2007). Roditelji ponekad imaju afinitet ka stvaranju potomaka povlaštenog spola (onog manje zastupljenoj u populaciji) jer tako osiguravaju prenošenje svojih gena u slijedeću generaciju, osim toga pripadnik povlaštenog spola ima veću mogućnost izbora partnera pa može bolje utjecati na kvalitetu potomstva (Oddie i Reim, 2001). S druge strane prikupljeni podatci odgovaraju samo jednoj generaciji ptica i u odrasloj populaciji odnos spolova bi mogao biti znatno drugačiji. Prikupljeni podatci pokrivaju samo 2 gnijezda u koloniji po vrsti, odnosno 2 para roditelja pa se može zaključiti da su dobiveni rezultati slučajnost.

Razlog malom broju prstenovanih ptića tijekom 2015. godine u mješovitoj koloniji na ribnjacima Jasinje je pomak sezone gniježđenja zbog izuzetno povoljnih klimatskih uvjeta, te su u trenutku prstenovanja većina mladih ptica već bile sposobne za let i nije ih bilo moguće prstenovati. Da bi se dobio potpuni uvid u stabilnost ove populacije u smislu ravnoteže spolova potrebno je istraživanje ponavljati kroz više sezona, te obuhvatiti što veći broj gnijezda. Ovo je prvo istraživanje provedeno na gnijezdećoj populaciji porodice čaplji (Ardeidae) u kojem je korišten *CHD* gen kao molekularni biljeg za određivanje spola.

5. Zaključci

1. U ovom radu utvrđeno je da su za istraživanja molekularne ekologije i populacijske genetike čaplji pera mladih ptica najbolje tkivo za izolaciju DNA.
2. Usporedbom dviju metoda izolacije DNA utvrđeno je da standardni protokol za izolaciju DNA dao bolje rezultate što se tiče količine izolirane DNA.
3. Uspješno je utvrđen spol deset od jedanaest jedinki čija su pera prikupljena tijekom prstenovanja čaplji čime se dokazuje da su molekularni biljezi poput *CHD* gena primjenjivi za određivanja spola vrsta porodice (Ardeidae).
4. Opsežnijim višegodišnjim istraživanjima mogao bi se utvrditi odnos spolova u populaciji, stabilnost populacije te poduzeti potrebne mjere zaštite gnijezdeće populacije čaplji u Hrvatskoj.

6.Literatura

Ansari H, Takagi N, Sasaki M 1988, Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenetical Cell Genetics* 47: 185-188.

Benčina L, Rožac V, Bolšec B 2011. *Plan upravljanja Parkom prirode Kopački rit*. Javna ustanova Park prirode Kopački rit. Lug, 131 pp.

BirdLife International 2012a. *Ardea alba*. The IUCN Red List of Threatened Species 2012: e.T22697043A38997545. http://dx.doi.org/10.2305 (13.09.2015).

BirdLife International 2012b. *Ardea cinerea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2012: e.T22696993A40287322. http://dx.doi.org/10.2305 (13.09.2015).

BirdLife International. 2012c. *Ardea purpurea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2012: e.T22697031A40297602. http://dx.doi.org/10.2305 (13.09.2015).

Chapman AC 2012. *Development of novel high-resolution melting (hrm) assays for gender identification of Caribbean Flamingo (Phoenicopterus ruber ruber) and other birds*. Master of Science Thesis. Texas A&M University and the Graduate Faculty of the Texas A&M University. USA 84.pp.

Chue J, Smith CA 2010. Sex determination and sexual differentiation in the avian model, *The Febs Journal*, 278:1027-1033

De Volo SB, Reynolds RT, Douglas MR, Antolin MF 2008. An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers, *The Condor* 110(4):762–766

Del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J 1992. *Handbook of the birds of the world*, volume 1: Ostrich to Ducks, Lynx Edicions, Barcelona, 696 pp.

Dolenec P, Šinko T 2009. *Molekularno određivanje spola ptica na temelju razlika CHD-W i CHD-Z gena*. Rad predan za rektovu nagradu. Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.30 pp.

Donald PF 2007. Adult sex ratio in wild bird populations, *Ibis* (149)671–692.

Donohue KC i Dufty AM Jr. 2006. Sex determination of Red-tailed Hawks (*Buteo jamaicensis calurus*) using DNA analysis and morphometrics. *Journal of Field Ornithology* 77:74-79.

Državni zavod za zaštitu prirode 2005. Od planina do mora, močvarna staništa rade za nas. Zagreb (preuzeto s: http://www.dzzp.hr/publikacije/letci/od-planina-do-mora-mocvarnastanista-rade-za-nas-431.html) 23.8. 2015.

Dubiec A, Zagalska- Neubauer M 2005. Molecular techniques for sex identification in birds, *Biological Lett*ers 43(1): 3-12.

Fontana-Pudić K 2010. *Ekološka obilježja žličarke (Platalea leucorodia L.) u Hrvatskoj*. Magistarski rad. Zoologijski zavod. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 76.pp.

Fridolfsson AK, Ellegren H 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds, *Journal of Avian Biology* 30:116-121.

Fridolfsson AK, Cheng H, Copeland NG ,Jenkins NA Liu HC, Raudsepp T, Woodage T, Chowdhary B, Halverson J, Ellegren H 1998 Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95(14): 8147–8152

Gill FB 2006. *Ornithology* W.H. Freeman and Company, New York, 379.pp.

Greb SF, DiMichele WA, Gastaldo RA 2006. Evolution and importance of wetlands in earth history. *Geological Society of America Special Papers*, 399, 1-40.

Griffiths R, Double MC, Orr K, i Dawson RJG 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7:1071-2075.

Griffiths R, Tiwari B 1993. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proceedings of the National Academy of Science USA, Genetics* 90:8324-8326.

Hancock J, Elliott H 1978. *The herons of the world*. London Editions, 304.pp.

Hanckock JA, Kushlan JA, Kahl MP 1992. *Storks, Ibises and Spoonbills of the World*. Academic Press, San Diego, USA, 336.pp.

Hogan FE, Cooke R, Burridge CP, Norman JA 2007. Optimizing the use of shed feathers for genetic analysis. *Molecular Ecology Resources*, 8/3 561-567

Horvat 2011. *Gniježđenje i dinamika populacije sive čaplje (Ardea cinerea Linnaeus 1758) u Hrvatskoj*. Diplomski rad. Prirodoslovno- matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. 65 pp.

Huang X, Zhou X, Lin Q, Fang W, Chen X 2012. An efficient molecular sexing of the vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*) from faeces samples. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 391-393.

Kralj J, Barišić S, Tutiš V, Ćirković D 2013. *Atlas selidbe ptica Hrvatske*.Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Razred za prirodne znanost, Zavod za ornitologiju. Zagreb 180 pp.

Kostadinović N, 2013, *Gniježđenje bijele žličarke Platalea leucorodia L. 1758. u Posebnom ornitološkom rezervatu Krapje Đol, Park prirode Lonjsko polje tijekom 2013. Godine.* Diplomski rad. Odjel za biologiju, Sveučilište Jospia Jurja Strosmayera u Osijeku. 54 pp.

Kovačić DA, David MB, Gentry LE, Starks KM, Cooke RA 2000. Effectiveness of Constructed Wetlands in Reducing Nitrogen and Phosphorus Export from Agricultural Tile Drainage, *Reprinted from the Journal of Environmental Quality* Volume 29, no. 4, 1262-1274.

Kralj J, Barišić S 2013. Rare birds in Croatia. Third report of the Croatian Rarities Committee, *Natura Croatica*, Volume 22, no. 2, 375–396.

Kushlan JA 2007. *Conserving Herons. A Conservation Action Plan of the Herons of the World*. Tour Du Valat, France, 93 pp

Lee MY, Hong YJ, Park SK, Kim YJ, Choi TY, Lee H, Min MS 2008. Application of Two Complementary Molecular Sexing Methods for East Asian Bird Species. *Genes & Genomics* 30(4): 365-372.

Mikuška J, Bogdanović T, Mikuška T, Mikuška A, Šalić V 2005. Size and distribution of breeding colonies of Grey Heron *Ardea cinerea* in lowland Croatia. *Acrocephalus* 26 (124):37-40.

Mikuška T, Šetina N, Hucaljuk M, 2012. Praćenje gnijezdeće populacije ptica mješovite kolonije u Ornitološkom rezervatu Krapje Đol. Hrvatsko društvo za zaštitu ptica i prirode, Osijek. 9 pp.

Morinha F, Cabral JA, Bastos E 2012. Molecular sexing of birds: A comparative review of plymerase chain reaction (PCR) based methods. *Theriogeneology* 78: 703-714.

Oddie KR, Reim C 2001. Egg sex ratio and paternal traits: using within individual comparisons, *Behavioral Ecology* vol. 13 No. 4: 503–510.

Ohno S. 1967. *Sex chromosomes and sex-linked genes*, vol 1. Springer Verlag, Berlin, 73-81pp.

Orkić I 2013. *Gniježđenje i dinamika populacija kolonijalnih vrsta čaplji (Ardeidae) u posebnom ornitološkom rezervatu Krapje Đol, Park prirode Lonjsko polje*. Diplomski rad. Odjel za biologiju, Sveučilište Jospia Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 62 pp.

Trimbos BT, Broekman J, Kentie R, Musters CJM, de Snoo G 2009. Using eggshell membranes as a DNA source for population genetic research. *Journal of Ornithology* 150(4):915-920

Tutiš V, Kralj J, Čiković D, Barišić S 2013. *Crvena knjiga ptica Hrvatske*. Ministarstvo zaštite okoliša i prirode i Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.257 pp.

Vučičević M, Stevanov-Pavlović M, Stevanović J, Bosnjak J, Gajić B, Aleksić N, Stanimirović Z 2013. Sex Determination in 58 Bird Species and Evaluation of CHD Gene as a Universal Molecular Marker in Bird Sexing. *Zoo Biology* 32: 269–276.

Wang, Z., Zhou, X., Lin, Q., Fang, W., & Chen, X. (2011). New primers for sex identification in the Chinese Egret and other ardeid species. *Molecular ecology resources*, 11: 176-179.

Westlake DF, Květ J, Szczepański A 1998. *The Production Ecology of Wetlands*, Cambridge University Press, Cambridge. 568 pp.

Web stranice:

web1:

http://www.dzzp.hr/projekti/zavrseni-projekti/inventarizacija-mocvarnih-stanista-uhrvatskoj-771.html, 06.09.2015.

web 2:

http://www.zastita-prirode.hr/, 23. 8. 2015.

web 3:

http://ibc.lynxeds.com/photo/great-white-egret-egretta-alba/great-white-egret-walking-through-reeds-river-bank, 24. 8. 2015.

web 4:
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/76/Grey_Heron_(Ardea_cinerea)_in_AP_W_IMG_4038.jpg, 8. 9. 2015.

web 5:
http://www.tbparis.com/photos/birds/Birds%20My%20Favorites/slides/Purple%20Heron%20(Ardea%20purpurea).html, 24. 8. 2015.

web 6:

http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/, 21.8. 2015.

web 7:

http://croatiabirding.hr/fields/jelas-field/, 24. 8. 2015.