Odnos spolova bijelih roda (Ciconia ciconia L. 1785) na području Podunavlja

Marelja, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:181:671981

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

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

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Matea Marelja

Odnos spolova bijelih roda (*Ciconia ciconia* L. 1785) na području Podunavlja

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Odnos spolova bijelih roda (*Ciconia ciconia* L. 1785) na području Podunavlja

Matea Marelja

Rad je izrađen u: Zavod za zoologiju

Mentor: doc. dr. sc. Alma Mikuška

Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Lidija Begović

Kratak sažetak završnog rada:

Bijela roda (*Ciconia ciconia* L. 1785) iz porodice Ciconiidae, naša je najveća i najpoznatija selica u kontinentalnom dijelu Hrvatske. Cilj završnog rada bila je analiza odnosa spolova bijelih roda na području Podunavlja izolacijom DNA iz pera. Za istraživanje je korišten standardni protokol za izolaciju genomske DNA. Utvrđen je spol za 42 jedinke, od čega je 27 mužjaka, a 15 ženki. Odnos spolova unutar populacije važan je faktor stabilne populacije, stoga je važno nastaviti provoditi sezonska istraživanja odnosa spolova roda u Podunavlju, ali i cijeloj Hrvatskoj.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: bijela roda, *Ciconia ciconia*, izolacija DNA, Podunavlje, pero

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Undergraduate university study programme in Biology
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Biology

The sex ratio of white storks (*Ciconia ciconia* L. 1785) in the Podunavlje area

Matea Marelja

Thesis performed at: Sub Department of Zoology

Supervisor: doc. dr. sc. Alma Mikuška

Assistant Supervisor: dr. sc. Lidija Begović

Short abstract:

White stork (*Ciconia ciconia* L. 1785), a member of the Ciconiidae family, is our biggest and best-known migratory bird in the Continental part of Croatia. The aim of this thesis was to analyze the sex ratio of white storks in the Podunavlje area, by isolating DNA from the samples of feathers. We used the standard protocol for isolating genomic DNA. A sex for 42 individuals was established, there were 27 males and 15 females. One of the most important factors for the stable population is the sex ratio, so it is important that seasonal research focused on the sex ratio are continued in both Podunavlje, but also the whole of Croatia.

Original in: Croatian
Key words: white stork, *Ciconia ciconia*, DNA isolation, Podunavlje, feather

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Opis vrste *Ciconia ciconia* (bijela roda) 2

1.2. Prehrana 3

1.3. Rasprostranjenost vrste 4

1.4. Stanište 5

1.5. Migracije 5

1.6. Razmnožavanje 6

1.7. Određivanje spola kod ptica 7

1.8. Cilj rada 8

2. MATERIJALI I METODE 9

2.1. Uzorkovanje pera 9

2.2. Izolacija DNA 10

2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR) i elektroforeza u gelu 11

3. REZULTATI 12

4. RASPRAVA 16

5. ZAKLJUČCI 17

6. LITERATURA 18

1. UVOD

Na strukturu, dinamiku i stabilnost populacije utječe i odnos između spolova unutar populacije. Pticama je često nemoguće odrediti spol samo na temelju morfoloških osobina, stoga se provode molekularne analize sekvenca DNA kako bi se otkrilo je li jedinka mužjak ili ženka. Rezultati nam pomažu kako bi omogućili stabilnost određenoj populaciji, ali i kako bi omogućili odgovarajuću zaštitu za ugrožene vrste.

Bijela roda (*Ciconia ciconia*) strogo je zaštićena Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/13) i Pravilnikom o proglašenju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 144/13).Tako je Republika Hrvatska trajno zaštitila bijele rode, a kažnjivo je uznemiravanje, rušenje gnijezda, uništavanje jaja i ubijanje mladih i odraslih jedinki. Bijela roda pripada kategoriji vrsta s niskorizičnom ugroženosti (engl: NT, Near Threatened) (Tutiš i sur. 2013), a može se očekivati da će u bližoj budućnosti postati ugrožena zbog promjena u okolišu (isušivanje livada i močvara, kanaliziranje rijeka) nestanka plijena zbog uporabe pesticida, urbanizacije i industrijalizacije (Hancock i sur. 1992), a ne smijemo zaboraviti ni nedostatak pogodnih mjesta za gniježđenje (del Hoyo i sur. 1992).
Svrha ovog rada je izračunati brojnost spolova populacije roda koja živi na području Podunavlja, s ciljem korištenja podataka istraživanja u višegodišnjem monitoringu populacije bijelih roda.

1.1 Opis vrste *Ciconia ciconia* (bijela roda)

Bijela roda (*Ciconia Ciconia* L. 1785) ptica je selica koja pripada porodici Ciconiidae, a koja je unutar roda Ciconiiformes. To je velika ptica, visine između 100 i 115 cm, krila su joj promjera 155 do 165 cm, a težina odrasle jedinke varira između 2 kg i 5 kg (Heinzel i sur., 1999). Ne postoji dimorfizam spolova pa su tako i mužjaci i ženke identični, osim u cjelokupnoj veličini tijela, gdje ipak malo prednjače mužjaci (del Hoyo i sur., 1992). Tijelo joj je prekriveno bijelim perjem, uz iznimku letnih pera na krilima koja su crne boje zbog melanina. (Grande i sur., 2004).



Slika 1. Odrasla bijela roda (web 1)

Odrasla jedinka ima dug i jak crveni kljun te duge, tanke crvene noge. Boja kljuna i nogu potječe od karotenoida koji su vrlo važni u prehrani roda (del Hoyo i sur., 1992). Duge noge sprječavaju rode da se smoče, a dugi kljun olakšava im lov u muljevitom dnu. Nema pjevalo (syrinx) pa se glasa klepetanjem ili piskutanjem, udarajući gornji i donji do kljuna, izvijajući pritom svoj dugi vrat unatrag. Mladi ptići koji su se tek izlegli izgledaju puno drugačije od svojih roditelja. Tamno perje, crni kljun, područja gole kože bez perja te ružičaste noge obilježja su mladih

ptića, a pravo perje i ostala obilježja odraslih jedinki dobivaju najčešće tijekom drugog ljeta njihova života. Životni vijek im je oko 25 godina, dok je najstarija prstenovana roda bila mužjak, star preko 33 godine (del Hoyo i sur., 1992).

1.2. Prehrana

Bijela je roda mesojed i hrani se živim plijenom. Ribu će uloviti u plitkim ribnjacima, u rubovima rukavaca rijeka, te u zaostalim vodama, tj. poplavnim područjima. Na poplavnim livadama traga za žabama, zmijama, puževima i gujavicama, a na suhim pokošenim livadama traži kukce, posebno veće skakavce. Poznati su prizori u kojima bijele rode prate traktore na oranicama te iz nastalih brazda love male sisavce, miševe i voluharice. Takvim izborom plijena bijela roda hrani i svoje mladunce (Vrezec, 2009). Mladunci konzumiraju hranu koju su roditelji ulovili i donijeli u ždrijelnoj vrećici, a zatim ju poluprobavljenu povratili. Mlade rode rastu prilično brzo jedući takvu poluprobavljenu hranu koja sadrži sve potrebne elemente za njihov rast i razvoj, posebno esencijalne kiseline (del Hoyo i sur., 1992).

Rode love najčešće preko dana, na mjestima gdje je vegetacija niska, a koja su u blizini gnijezda (udaljenost otprilike 5 km) (del Hoyo i sur., 1992). Sitan plijen gutaju u cijelosti, a veće životinje rastrgaju prije gutanja. (Cramp, 1977).



Slika 2. Odrasla roda s plijenom u ustima (web 2)

1.3. Rasprostranjenost vrste

Ciconia ciconia ima areal diljem Palearktičke regije, obuhvaćajući velik dio Europe i manji dio Azije – područje gniježđenja, dok tijekom zime migriraju sve do centralne i južne Afrike – područje zimovanja. Rasprostranjena je u Europi (Portugal, središnja Španjolska, Francuska, od Njemačke do Crnog Mora), na Bliskom istoku (Turska, Izrael i Irak), i sjevernoj Africi (Maroko, Alžir i Tunis) (Frenz, 1995), dok je u Aziji prisutna podvrsta bijele rode Ciconia ciconia asiatica (između Aralskog jezera i provincije Xinjiang u zapadnoj Kini) (Frenz, 1995). Europska populacija bijele rode se na temelju njihovih migracijskih putova i područja zimovanja dijeli na: zapadnu preletnu populaciju te na istočnu preletnu populaciju. U Poljskoj gnijezdi čak 20% svjetske populacije (52.500 parova) (Czarnecka i Kitowski 2013), dok se populacija u Hrvatskoj procjenjuje se na 1.100 – 1.300 parova. (Kralj i sur. 2013).

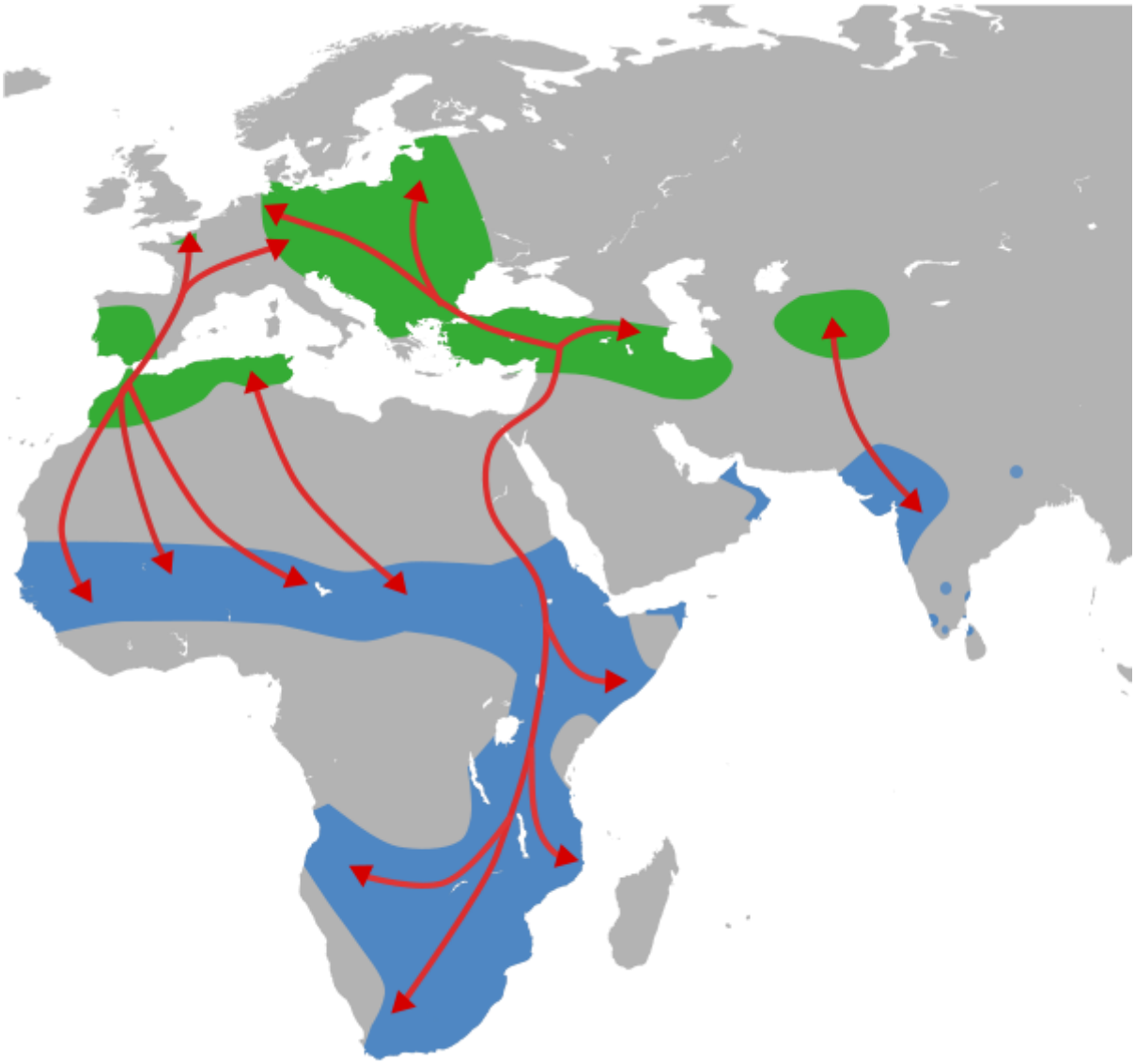
1.4. Stanište

Rode se gnijezde na vlažnim i poplavnim staništima (poplavne livade, vlažne šume), gdje imaju dovoljne količine plijena, ali su također vezane i uz staništa nastala ljudskom aktivnošću (gradovi, sela, poljoprivredna zemljišta) koja su okružena vlažnim livadama, travnjacima, pašnjacima i slično, koja su bogata njihovim plijenom, npr. vodozemcima, ribama i gmazovima. Najgušća gnijezdeća populacija roda u Hrvatskoj nalazi se u Parku prirode Lonjsko polje (Čigoć) uz poplavne nizine rijeke Save i Lonje (Vizner 2010). Najbogatija su im staništa poplavni pašnjaci uz Savu nakon povlačenja poplave u proljeće i rano ljeto: u brojnim lokvama i plićacima obilato love zarobljene ribe ,vodozemce i gmazove (web 3). Bijela roda jedna je od rijetkih vrsta ptica koje slobodno žive u prirodi, a ipak je usko vezana uz ljude: svojom prehranom i izborom mjesta za gniježđenje (gnijezda na kućama u selima i elektrovodovima) (del Hoyo i sur. 1992).

1.5. Migracije

Rode su selice koje migriraju na jug tijekom zime zbog nedostatka i nedostupnosti hrane na sjevernim područjima. Putuju sve do centralne i južne Afrike, put od 12 000 km, i to samo danju, a da bi prevalile veće udaljenosti moraju jedriti na toplim zračnim strujama, zvanim termali. Ulazeći u termal, rodu podiže uzlazna zračna struja. Kad izađe iz termala, ona lagano klizi naniže preko velikih udaljenosti. Što više ptica putuje zajedno, lakše im je pronaći dobar termal - stoga velika jata sele brže od pojedinačnih ptica. U jesen se mogu vidjeti jata sa skoro 10 000 ptica (web 4).

Tijekom migracije izbjegavaju velike vodene površine kao što je Sredozemno more, jer iznad mora nema termala koje mogu koristiti za jedrenje, a postoje dva glavna puta migracija – istočni i zapadni (slika 3). Istočni migracijski put prolazi kroz Bospor do Turske, preko Levanta te slijedi dolinu rijeke Nil prema jugu. Zapadni migracijski put vodi preko Gibraltara sve do zapadnih dijelova Afrike. Zapadnoeuropska populacija ne seli do krajnjeg juga afričkog kontinenta već zimuje u sub-Saharskoj Africi (Hanckock i sur. 1992). Rode iz Hrvatske propadaju istočnoj populaciji (Kralj i sur. 2013).



Slika 3. Migracije bijele rode (web 5)

1.6. Razmnožavanje

Sezona razmnožavanja bijelih roda počinje u rano proljeće, kada se prvi mužjaci vrate s juga. Mužjaci dolijeću prvi i odmah počinju s obnovom gnijezda koje su koristili prošle godine. Postoje zapisi o gnijezdima koja su bila korištena svake godine tijekom 100 godina. Gnijezdo grade od grančica na drveću, krovovima kuća, stupovima, elektrovodovima, stijenama (del Hoyo i sur. 1992), a najčešće se nalazi oko 30 m iznad tla (Brown i sur. 1982).

Rode su monogamne, pa je tako isti par zajedno sve dok jedan od njih ne umre. Svake godine mužjak i ženka si međusobno udvaraju, kako bi očvrsnuli svoju vezu. Osim zanimljive i intimne plesne koreografije rode si udvaraju i zabacujući glavu skroz unatrag, glasno klepećući

kljunovima. Obnova i briga za gnijezdo nije isključivo na plećima mužjaka, jer mu i ženka pomaže skupljajući grančice i ostali materijal (Cramp 1977), ali isto je tako i briga za mlade podijeljena između roditelja.

Ženka polaže između tri i šest jaja, a nakon svega mjesec dana ležanja na jajima na svijet dolaze ptići koji nisu posve bespomoćni, ali ipak im treba danonoćna roditeljska briga. Mužjak i ženka regurgitiraju (povraćaju) hranu koju su prethodno progutali, natrag u kljun te tako hrane svoje mladunce. Nakon otprilike dva mjeseca mladunci su posve prekriveni perjem, a osamostaljuju se tjedan ili dva dana kasnije (del Hoyo i sur. 1992).

1.7. Određivanje spola kod ptica

Odnos spolova u populaciji vrlo je bitan za stabilnost populacije. Kod roda je, ali i većine ptica, vrlo teško odrediti spol na temelju morfologije, jer nema pojave spolnog dimorfizma. 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 (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. Odrediti spol pomoću spolnih kromosoma možemo na dva načina – citološkom metodom (uzgoj kulture stanica i pregled pod mikroskopom) i molekularnom metodom (izolacija DNA) (Fridolffson i sur. 1998). Najjednostavnija i najučinkovitija je metoda određivanja spola pomoću CHD gena.

CHD (chromo-helicase-DNA binding gene) je gen koji ima ulogu u kontroli transkripcije na kromatinskoj razini te utječe na kondenzaciju kromatina, stoga je vrlo konzerviran kod svih vrsta ptica. Kod različitih spolova ga nalazimo u različitom obliku pa tako 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). Koristeći ovu metodu određivanja spola, nakon PCR reakcije i elektroforeze, dobije jedna pruga ukoliko se radi o mužjacima, a dvije pruge kod ženki (Friddolffson i Ellegren 1999).

1.8. Cilj rada

Cilj završnog rada je odrediti odnos spolova prstenovanih jedinki bijele rode (*Ciconia Ciconia* L. 1785) na području Podunavlja tijekom 2016. godine uz pomoć CHD gena.

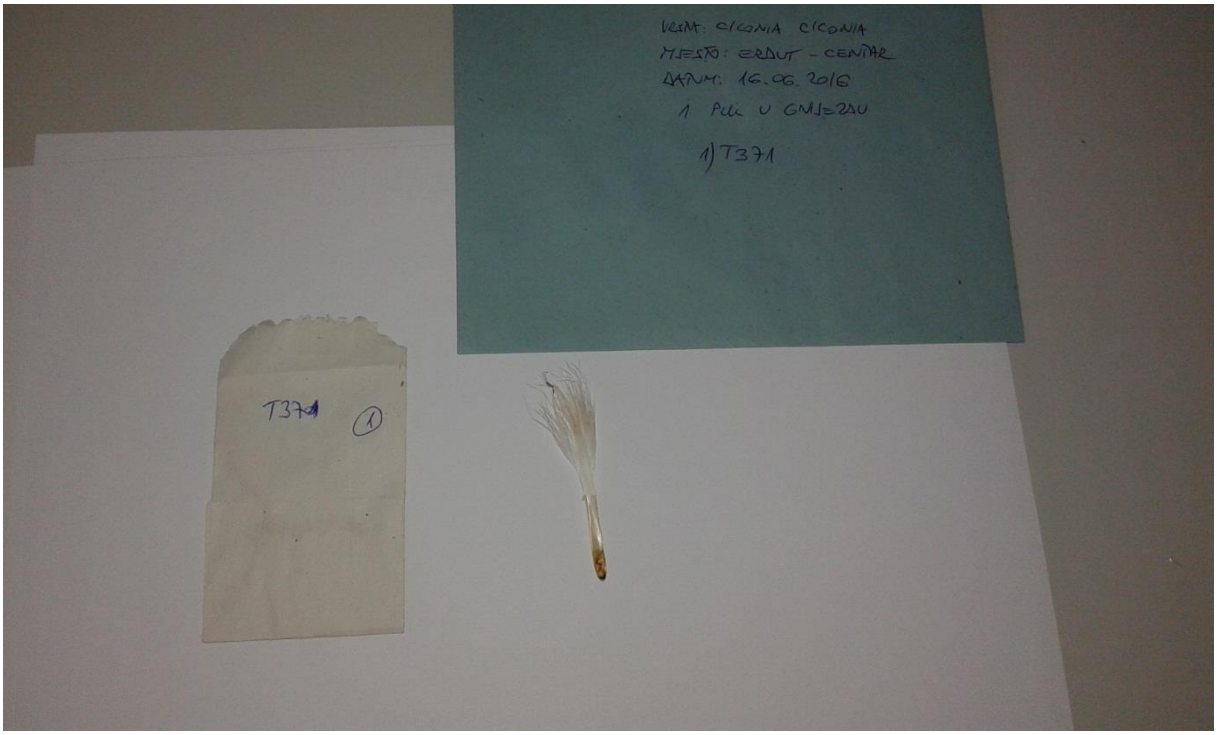
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorkovanje pera

Konturna pera potrebna za istraživanje prikupljena su prilikom prstenovanja roda na području Podunavlja (Bijelo Brdo, Kopačevo, Borovo Selo, Erdut, Petrijevci, Donji Miholjac, Aljmaš, Dalj, Belišće i Šag).

Kako bi se pera mogla koristiti u istraživanju, ona moraju imati u sebi krvni ugrušak iz kojega se može izolirati DNA. Ptići se prstenuju prije nego nauče letjeti, a nakon što su dovoljno odrasli da ih prstenovanje ne ozljeđuje i uznemirava (Kušlan 2007). Prikupljanje uzoraka i prstenovanje ptića obavio je Tibor Mikuška, iz Hrvatskog društva za zaštitu ptica i prirode. Uzorci su pohranjeni u omotnice na sobnoj temperaturi, a nakon toga su analizirani u laboratoriju.

Pera su razvrstana u velike plave omotnice i to tako da su u jednoj omotnici sva pera iz istog gnijezda. Omotnice su označene datumom uzorkovanja, mjestom uzorkovanja, brojem ptića u gnijezdu te oznakom jedinke. Pera su unutar omotnice razvrstana u manje papirnate vrećice i to tako da su pera jedne jedinke u jednoj manjoj vrećici.

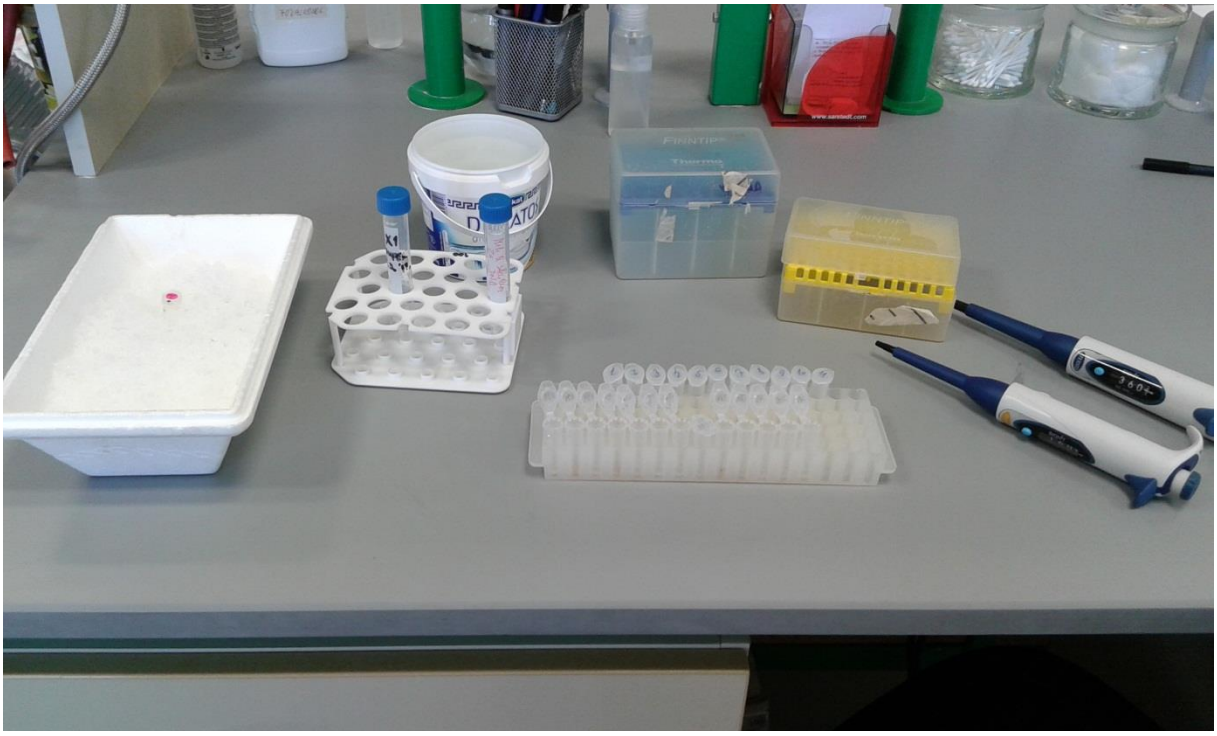


Slika 4. Uzorkovana pera, način označavanja i pohranjivanja (foto: M. Marelja)

2.2. Izolacija DNA

U laboratoriju je, sterilnim nožićem skalpela, odrezan komadić pera s krvnim ugruškom, a onda usitnjen na sitne komadiće duljine oko 2 mm. Uzorak je prebačen u tubicu za centrifugu od 1,5 mL. DNA iz uzorka izolirana je prema standardnom protokolu s modifikacijama (Begović i sur. 2017).

Za izolaciju DNA prvo pripremamo pufer X1 (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 mM NaCL i 2% natrij dodecil sulfat (SDS), pH=8,0). U svaku tubicu dodamo 360 µL pufera X1, 40 µL proteinaze K (20 mg mL^{-1}) i 16 µL 1M ditiotreitola (DTT). Uzorci su ostavljeni preko noći na digestiji na temperaturi od 56°C. Sutradan je prvo dodano 300 µL 3M natrijevog acetata, tubica s uzorkom je promiješana 20 sekundi i prebačena u centrifugu na 16 000 g, 10 min i 4°C (postavke centrifuge jednake su za sve korake protokola). Supernatant je prebačen u novu tubicu od 1,5 mL te je u njega dodan izopropanol (ohlađen na -20°C) u omjeru 1:1. Tubicu stavimo na inkubaciju 30 minuta na -20°C. Poslije inkubacije ponovno centrifugiramo (16 000 g, 10 min i 4°C). U digestoru izvučemo izopropanol iz tubice, pazeći da ne povučemo i talog, a talog isperemo s 1 mL 70% etanola, nakon čega je centrifugiramo (16 000 g, 10 min i 4°C). Supernatant bacimo, talog ostavimo da se suši na zraku 10-15 minuta, a na kraju DNA otopimo u 40 µL redestilirane vode. Tako pripremljen uzorak skladištimo na -20°C.



Slika 5. Pripreme prije rada u laboratoriju (foto: M.Marelja)

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

U sterilnoj komori za PCR pripremamo uzorke za umnažanje lančanom reakcijom polimeraze (PCR). U tubicu za dodajemo 10 μL Emerald Master Mix (Takara, Clontech), 2 μM svake početnice (2550F/2718R) i 30-50 ng DNA, a ostatak do ukupnog volumena od 20 μL dodajemo vode. Tubice prebacimo u PCR i namjestimo na sljedeće uvjete: početna denaturacija na 94°C 5 minuta, 40 ciklusa denaturacije na 94°C 30 sekundi, sparivanje početnica na 55°C 1 min, produživanje lanaca 72°C 2 min te završno produljivanje lanca na 72°C 7 min.

Uzorke nakon PCR reakcije nanesemo na gel za elektroforezu pripremljen s 2% agaroze, TAE puferom i bojom SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) u omjeru 1:10 000. U jažice stavimo 7 μL uzoraka, a u zadnju jažicu 3 μL DNA markera. Elektroforeza se provodi na 100 V, 80 mA, 35-60 minuta. Nakon elektroforeze gel prebacimo u UV transiluminator, a fotografiramo Kodak 1D 3.6 programom.

3. REZULTATI

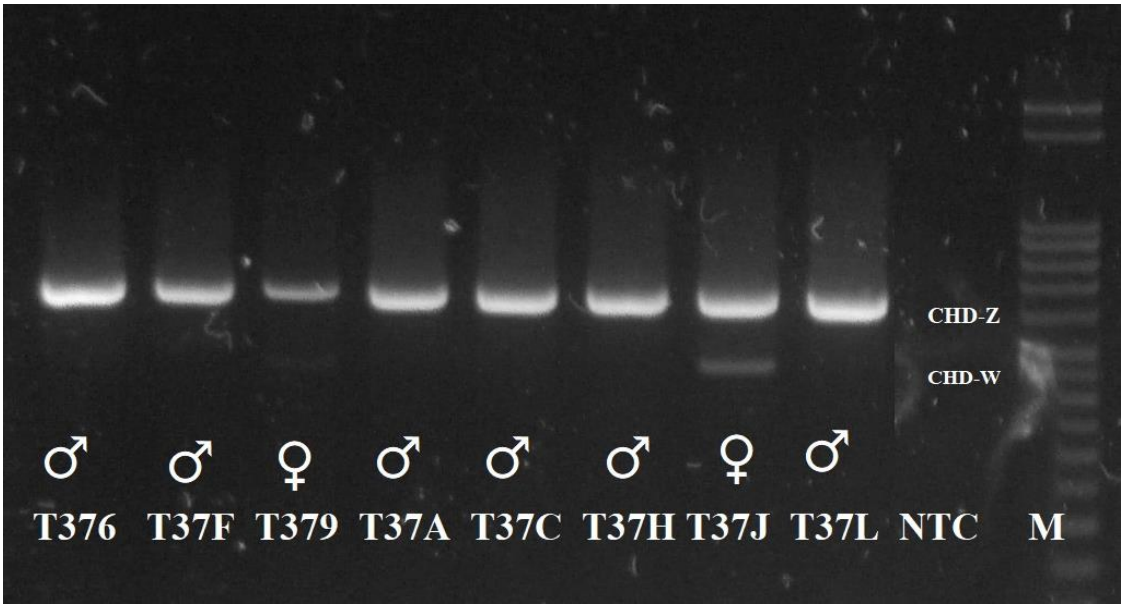
U ovom smo eksperimentu izolirali DNA iz pera te je količina dobivene DNA iskazana kroz koncentraciju, dok je omjer apsorbancije 260/280 nm pokazatelj čistoće DNA pri čemu se vrijednost od oko 1,8 smatra čistom DNA (Mihić, 2015). Gotovo svim uzorcima izmjerena je vrlo dobra čistoću DNA, osim T36R koji ima lošu čistoću (tablica 1).

Tablica 1. Usporedba koncentracije (iskazane koncentracijom DNA), čistoće uzoraka (260 nm/280 nm) i spol uzorka DNA bijele rode

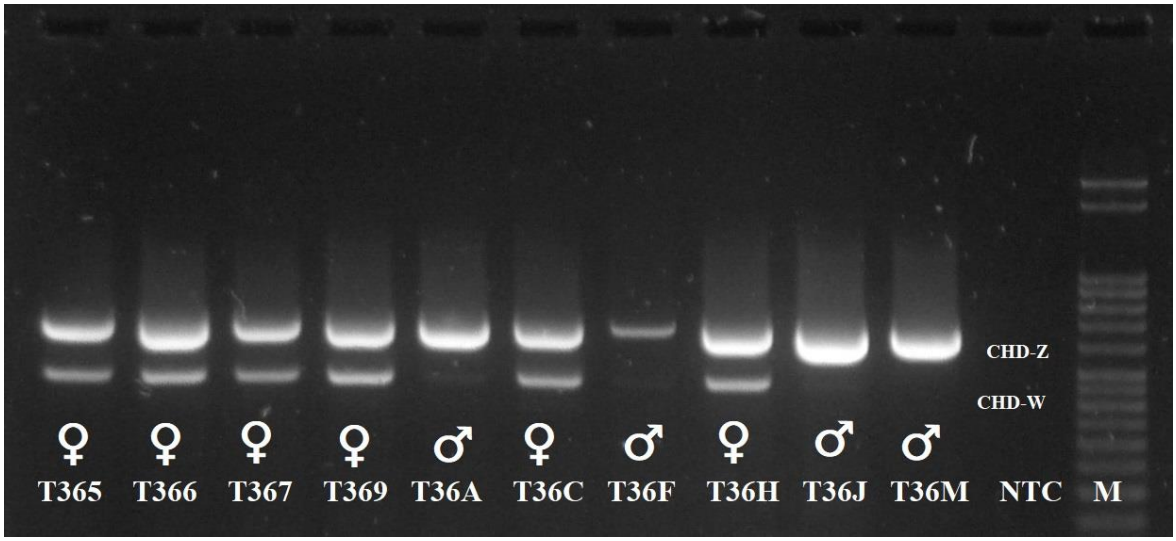
	UZORAK	DNA koncentracija (ng/ µL)	A260/A280	A260/A230	SPOL
1.	T376	300	1,866	2,425	mužjak
2.	T379	163	1,852	2,296	ženka
3.	T37A	222	1,820	2,537	mužjak
4.	T37C	110	1,826	2,833	mužjak
5.	T37F	611	1,886	2,332	mužjak
6.	T37H	141	1,730	2,474	mužjak
7.	T37J	66	1,808	3,0	ženka
8.	T37L	295	1,870	2,485	mužjak
9.	T365	362	1,918	2,339	ženka
10.	T366	310	1,922	2,372	ženka
11.	T367	595	1,865	2,338	ženka
12.	T369	460	1,905	2,289	ženka
13.	T36A	522	1,871	2,373	mužjak
14.	T36C	300	1,926	2,313	ženka
15.	T36F	608	1,919	2,170	mužjak
16.	T36H	418	1,902	2,339	ženka
17.	T36J	258	1,866	2,068	mužjak
18.	T36M	421	1,863	2,307	mužjak
19.	T36L	679	1,922	2,157	mužjak
20.	T36X	347	1,891	2,393	mužjak
21.	T37V	428	1,887	2,209	mužjak
22.	T37U	438	1,886	1,971	ženka
23.	T37X	422	1,873	2,342	ženka
24.	T37W	763	1,868	2,131	mužjak
25.	T360	416	1,863	2,147	mužjak
26.	T361	777	1,873	2,203	ženka
27.	T362	124	1,803	2,111	mužjak
28.	T364	426	1,856	2,173	ženka
29.	T363	200	1,789	2,361	mužjak
30.	T36N	55,5	1,850	3,171	nepoznato
31.	T36R	22	1,2	1,9	mužjak
32.	T371	383	2,896	2,253	mužjak
33.	TA12122	20,5	1,952	13,7	mužjak
34.	TA12119	68	1,766	2,957	mužjak
35.	TA12120	22,5	1,957	22,5	mužjak

36.	TA12121	44,5	1,816	4,684	ženka
37.	T412	60,5	1,891	3,025	ženka
38.	T413	230	1,825	2,396	mužjak
39.	T373	36,5	1,825	4,44	mužjak
40.	T372	136	1,489	1,522	ženka
41.	T377	112	1,874	2,720	mužjak
42.	T340	708	1,940	2,095	mužjak
43.	T341	604	1,904	2,227	mužjak

Na području Podunavlja prikupljeno je ukupno 43 uzoraka pera iz 19 različitih gnijezda, a spol je određen kod njih 42. Molekularnom metodom određivanja spola izolacijom genomske DNA određen je spol 27 mužjaka i 15 ženki (slike 6-10). Jedinki oznake T36N nije uspješno određen spol.

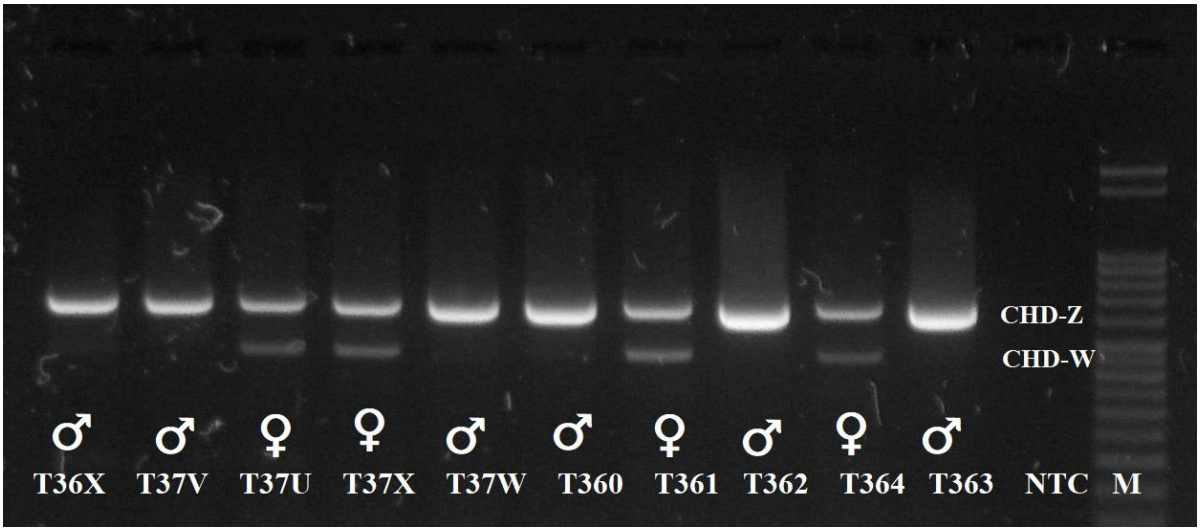


Slika 6. Rezultati molekularne metode određivanja spola izolacijom DNA. Oznake T— označavaju jedinku čiji je uzorak analiziran, simbol spola označava određeni spol, NTC je negativna kontrola, M molekularni marker, *CHD-Z* gen s 450 i *CHD-W* gen s 600 parova baza.

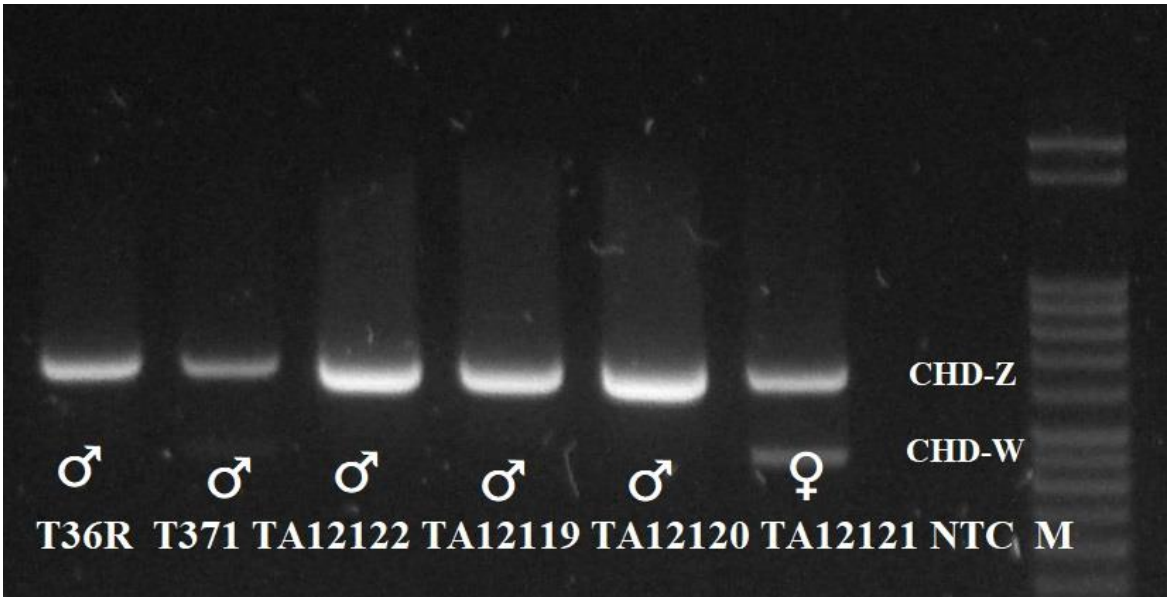


.

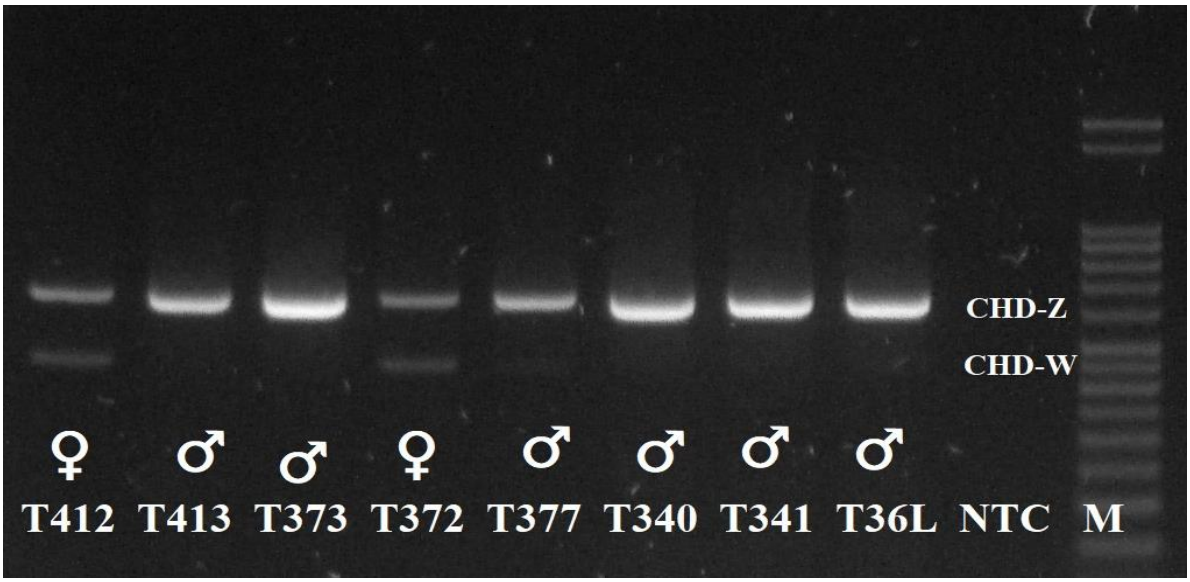
Slika 7. Rezultati molekularne metode određivanja spola izolacijom DNA. Oznake T— označavaju jedinku čiji je uzorak analiziran, simbol spola označava određeni spol, NTC je negativna kontrola, M molekularni marker, *CHD-Z* gen s 450 i *CHD-W* gen s 600 parova baza.



Slika 8. Rezultati molekularne metode određivanja spola izolacijom DNA. Oznake T— označavaju jedinku čiji je uzorak analiziran, simbol spola označava određeni spol, NTC je negativna kontrola, M molekularni marker, *CHD-Z* gen s 450 i *CHD-W* gen s 600 parova baza.



Slika 9. Rezultati molekularne metode određivanja spola izolacijom DNA. Oznake T— označavaju jedinku čiji je uzorak analiziran, simbol spola označava određeni spol, NTC je negativna kontrola, M molekularni marker, *CHD-Z* gen s 450 i *CHD-W* gen s 600 parova baza.



Slika 10. Rezultati molekularne metode određivanja spola izolacijom DNA. Oznake T— označavaju jedinku čiji je uzorak analiziran, simbol spola označava određeni spol, NTC je negativna kontrola, M molekularni marker, *CHD-Z* gen s 450 i *CHD-W* gen s 600 parova baza.

4. RASPRAVA

Ptice su specifične, ne samo po svojoj sposobnosti letenja, već i prema tome da im se najčešće ne može odrediti spol prema morfološkim obilježjima jer kod većine ne postoji spolni dimorfizam. Kod većine je spol gotovo nemoguće odrediti bez molekularnih metoda (Dubiec i Zagalska- Neubauer, 2005). Praćenje odnosa spola u određenoj populaciji važno je zbog zdravlja i opstanka svake populacije. (Chapman 2012).

Uzorci pera prikupljeni su na području Bijelog Brda, Kopačeva, Borova Sela, Erduta, Petrijevaca, Donjeg Miholjca, Aljmaša, Dalja, Belišća i Šaga, a ukupno iz 19 različitih gnijezda, prilikom godišnjeg prstenovanja roda. Prilikom prstenovanja uzima se uzorak konturnog pera s ugruškom krvi (koji je izvor DNA) i to direktno s ptice, kako bi se spol kasnije mogao dodijeliti određenom serijskom broju prstena. Standardni protokol prema kojemu je izolacija DNA rađena pokazao se veoma uspješnim, sa samo jednim neodređenim spolom, a razlog tome je vrlo vjerojatno ljudska greška. Uspješno je određen spol 42 jedinke – 27 mužjaka i 15 ženki. Odnos 1:0,68 ne odgovara načelima nasljeđivanja, jer bi u tom slučaju odnos spolova bio jednak. 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). Populacija je dinamična i u stalnom je kretanju, a s vremenom se mijenja njena veličina i njen unutarnji sastav. Jedinke emigriraju, imigriraju te migriraju, rađaju se i umiru, i bitno je pratiti prirodne fluktuacije između populacija i zastupljenosti spolova u njima. Kako bi se uvidjela stvarna stabilnost populacije i ravnoteža spolova, potrebno je sezonski ponavljati istraživanje i obuhvatiti što veći broj gnijezda.

Također, rezultati ovog istraživanja pomoći će u budućim istraživanjima koji za namjeru imaju pratiti disperziju bijelih roda na području Podunavlja. Utvrđena su dva tipa disperzije kod ptica: natalna i reproduktivna. Natalna disperzija je češća i jedinke prelaze puno veće udaljenosti nego tijekom reprodukcijske disperzije (Greenwood 1980). Do sada je u Hrvatskoj istraživana natalna disperzija bijelih roda u Parku prirode Lonjsko polje. Istraživane su rode koje su prstenovane prstenima u boji, te je zaključeno da 36,7% jedinki nije napustilo naselja u kojima su se izlegli, a 14,3% prešlo je udaljenosti veće od 50 km (Ječmenica i Kralj 2017).

5. ZAKLJUČCI

Istraživanje odnosa spolova bijele rode (*Ciconia ciconia*) na području Podunavlja 2016. godine dalo je sljedeće zaključke:

- u 19 različitih gnijezda prikupljeno je 43 uzoraka pera s različitih jedinki, od kojih su se 42 pokazala kao izvrstan izvor DNA pri izolaciji.
- Standardni protokol za izolaciju DNA je brz i veoma uspješan pri određivanju spola određene jedinke.
- Od 42 jedinke utvrđeno je 27 mužjaka i 15 ženki te je odnos spolova: 1:0,55.
- Važno je nastaviti sezonska istraživanja određivanja brojnosti spolova unutar populacije bijelih roda jer je to jedan od pokazatelja stabilnosti populacije.

6. LITERATURA

Begović, L., Mihić, I., Pospihalj, T., Mikuška, T., Mlinarić, S., Mikuška, A. (2017) Evaluation of methods for molecular sex-typing of three heron species from different DNA sources. Turkish Journal of Zoology 41: 593-598.

Brown, L.H., Urban, EK, Newman, K. (1982) The birds of Africa vol I. Academic Press, London.

Cramp, S. ed. (1977) Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa, the Birds of the Western Palearctic. Vol. 1: Ostrich to Ducks. Oxford University Press, Oxford.

Chapman, A.C. (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.

Czarnecka, J., Kitowski, I. (2013) The white stork as an engineering species and seed dispersal vector when nesting in Poland. Annales Botanici Fennici 50: 1-12.

De Volo, S.B., Reynolds, R.T., Douglas, M.R., Antolin, M.F. (2008) An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers, The Condor 110: 762–766.

Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. (1992) Handbook of the Birds of the World, Vol.1. Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona.

Donald, P.F. (2007) Adult sex ratio in wild bird populations, Ibis 149: 671–692.

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

Frenz L. (1995) Stőrche in Deutschland. – Scheibel, Berlin.

Grande, J.M., Negro, J. J., María Torres, J. (2004) The evolution of bird plumage colouration; A role for feather-degrading bacteria?, Ardeola 51.

Greenwood, P. J. (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. Animal Behaviour 28: 1140-1162.

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

Hanckock, J.A., Kushlan, J.A., Kahl, M.P. (1992) Storks, Ibises and Spoonbills of the World. Academic Press, San Diego.

Heinzel, H., Fitter, R., Parslow, J. (1999) Collinsov džepni vodič: Ptice Hrvatske i Europe: sa Sjevernom Afrikom i Srednjim Istokom. Hrvatsko ornitološko društvo. Zagreb..

Ječmenica, B., Kralj J. (2017) Disperzal of the White Stork Ciconia Ciconia in the Lonjsko polje Nature Park, Croatia. Larus 52: 35-48.

Kralj, J Barišić, S., Tutiš, V., Ćiković, D. (2013) Atlas selidbe ptica Hrvatske. Zaklada Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Zagreb.

Kushlan, J.A. (2007) Conserving Herons. A Conservation Action Plan of the Herons of the World. Tour Du Valat, France.

Mihić I. (2015) Određivanje spola pomoću CHD gena kod porodice čaplji (Ardeidae). Diplomski rad. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Osijek.

Ohno, S. (1967) Sex chromosomes and sex-linked genes, vol 1. Springer Verlag, Berlin, str. 73-81.

Tutiš, V., Kralj, J., Radović, D., Ćiković, D., Barišić, S. (ur.) (2013): Crvena knjiga ptica Hrvatske. Ministarstvo zaštite okoliša i prirode, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 258 str.

Vizner, M. (ur.). (2010) Zaštita i očuvanje bijele rode. Pilot projekt. Fond za zaštitu okoliša i energetsku učinkovitost. Zagreb,

Vrezec, A. (2009) Insects in the White Stork Ciconia ciconia diet as indicators of its feeding conditions: The first diet study in Slovenia. Acrocephalus 30: 25-29

Web izvori:

Web1. https://www.klikaj.hr/wp-content/uploads/2017/07/unnamed-4-12.jpg, preuzeto 9.7.2018.

Web2. https://53744bf91d44b81762e0-fbbc959d4e21c00b07dbe9c75f9c0b63.ssl.cf3.rackcdn.com/media/95/95A80906-188C-4BE3-AC34-05BD9C974F4F/Presentation.Large/White-stork-with-lizard-prey.jpg, preuzeto 10.7.2018.

Web3. http://lonjsko-polje.com/fauna/ptice/bijela-roda, preuzeto 7.7.2018.

Web4. http://www.springalive.net/ba-bs/springalive/stork_migration, preuzeto 7.7.2018.

Web5.https://en.wikipedia.org/wiki/File:WhiteStorkMap.svg, preuzeto 9.7.2018.