Usporedba metoda određivanja spola kod štekavca (Haliaeetus albicilla L 1785.) na temelju morfoloških i genetičkih biljega

Pospihalj, Tomislav

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:181:988295

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

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

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Tomislav Pospihalj

Usporedba metoda određivanja spola kod štekavca (*Haliaeetus albicilla* L 1785.) na temelju morfoloških i genetičkih biljega

Završni rad

Osijek, 2018. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Usporedba metoda određivanja spola kod štekavca (*Haliaeetus albicilla* L1785.) na temelju morfoloških i genetičkih biljega

Tomislav Pospihalj

Rad je izrađen u: Zavodu za zoologiju, Odjel za Biologiju

Mentor: Dr. sc. Alma Mikuška, docent
Komentor: Dr. sc. Lidija Begović, docent

Kratak sažetak završnog rada:
Cilj ovog rada bio je usporediti primjenjivost mjerenja širine tarzusa i molekularne metode za identifikaciju spola orla štekavca (*Haliaeetusalbicilla*) u Kopačkom ritu. Tijekom 2016. i 2017. godine izmjereno je ukupno 30 ptića tijekom sezone gniježđenja. Širina tarzusa izmjerena je digitalnim kalibarskim šestarom (kaliper) s preciznošću od 1/100 mm. Molekularno određivanje spola provedeno umnažanjem odsječaka CHD gena, lančanom reakcijom polimeraze (PCR), pomoću para početnica 2550F / 2718R. Na temelju DNA analize, identificirano je ukupno 13 mužjaka i 17 ženki. Rezultati mjerenja širine tarzusa pokazali su da mužjaci imaju tanji tarzus u usporedbi sa ženkama. Prosječna vrijednost za mužjake iznosila je 13,17 mm, a za ženke 14,70 mm. Upotrebom ove metode identificirano je 76% mužjaka i 70% ženki. Osim morfometrijskog određivanja spola, potrebno je i molekularnog određivanje spola, osobito kod ptića s širinom tarzusa blizu granične vrijednosti (13,8 mm). Daljnja istraživanja također trebaju uključiti i druge morfometrijske parametre kako bi se izbjegli dvojbeni rezultati.

Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: orao, debljina tarzusa, *CHD*, morfometrija

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

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

Comparison of sex determination methods in White-tailed Eagle (*Haliaeetus albicilla* L 1785.) based on morphological and genetical markers

Tomislav Pospihalj

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

Supervisor: PhD Alma Mikuška, Assistant professor
Co-supervisor: PhD Lidija Begović, Assistant professor

Short abstract: The aim of this thesis is to compare the applicability of tarsus width measurement and molecular method for sex identification of White-tailed Eagle (*Haliaeetus albicilla*) nestlings in Kopački rit. A total of 30 nestlings were measured during breeding seasons in 2016 and 2017. Tarsus width was measured with digital calliper with the precision to 1/100 of mm. Sex-typing of nestlings was performed by PCR amplification of *CHD* gene using primer pair 2550F/ 2718R. Based on DNA analysis, a total of 13 males and 17 females were determined. Results of tarsus measurements showed that males had thinner tarsus compared to females with average value of 13.17 mm and 14.70 mm, respectively. By using this method 76% of males and 70% of females was identified correctly. In addition to morphometric sex determination, molecular sex determination is also necessary, especially in nestlings with tarsus width close to the cut-off value (13.8 mm). Further research should also include other morphometric parameters to avoid ambiguous results.

Original in: Croatian

Keywords: eagle, tarsus width, *CHD*, morphometry

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. Rasprostranjenost i biologija vrste 1

1.2 Određivanje spola kod ptica 1

1.3 Morfometrijske metode određivanja spola 2

1.4 Molekularno određivanja spola pomoću *CHD* gena 2

1.5. Cilj rada 3

2. Materijali i metode 4

2.1. Uzorkovanje materijala za izolaciju DNA **4**

2.2. Morfometrijska mjerenja 5

2.3. Izolacija DNA 5

2.4 Lančana reakcija polimerazom (PCR) 5

2.5 Gel elektroforeza 6

3. Rezultati 6

3.2. Debljina tarzusa kod mužjaka i ženki 6

3.2. Usporedba morfometrijskog i molekularnog određivanja spola 7

4. Rasprava 10

5. Zaključci 12

6. Literatura 13

1. Uvod

1.1. Rasprostranjenost i biologija vrste

Ukupna svjetska populacija orla štekavca procijenjena je na 20 000 - 49 999 jedinki od čega je u Europi 9000- 12300 parova (BirdLife International,2017).U Hrvatskoj je 2013. godine ukupna gnijezdeća populacija procijenjena na 135-155 parova (Mikuška T. u Tutiš i sur.2013). Populacija orla štekavca u Hrvatskoj ima status ugrožene svojte temeljem Crvene knjige ugroženih vrsta ptica Hrvatske (Tutiš i sur. 2013) te je proglašena strogo zaštićenom vrstom sukladno odredbama Zakona o zaštiti prirode i Pravilnika o proglašavanju svojti strogo zaštićenima i zaštićenima (NN 80/2013).

Najbrojnija populacija ove vrste je u preostalim velikim prirodnim vlažnim područjima: u Donjoj Posavini (Lonjsko polje) s 28 – 30 parova i u Podunavlju (osobito Kopački rit) s 42 – 45 parova. Redoviti monitoring dijela gnijezdeće populacije orla štekavca odvijao se krajem 80-tih godina prošlog stoljeća, koji je u području parkova prirode Kopački rit i Lonjsko polje nastavljen nakon Domovinskog rata (Radović i Mikuška 2009).

Sezona gniježđenja započinje krajem siječnja zauzimanjem teritorija i izgradnjom ili popravljanjem gnijezda. Ženka leže od 1 - 3 jaja, a inkubacija traje 35 - 38 dana pri čemu sudjeluju oba roditelja. Mladi su čučavci koje roditelji hrane u gnijezdu slijedećih 70 - 86 dana .Broj mladih u gnijezdu može biti 1-2, vrlo rijetko čak i 3. Kod orlova štekavaca «kainizam» tj. pojava da stariji i/ili jači ptić ubije mlađeg nije obvezan. Stoga, u sezonama kada ima dovoljno hrane i kod onih parova koji su dovoljno sposobni osigurati tu hranu mladima, nerijetko do izletanja prežive oba ili čak tri ptića (Radović i Mikuška 2009).

1.2 Određivanje spola kod ptica

Podaci o spolu pojedinih organizama i odnos spolova u populacijama vrlo su važni na području ekologije i zaštite vrsta. Utvrđivanje spola kod ptica putem morfoloških obilježja je problematično budući da 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), pogotovo kod mladih spolno nezrelih ptica koje nemaju svadbeno ruho (Griffiths i Tiwari, 1993, Fridolfsson i Ellegren, 1999).Mnoge vrste ptica grabljivica pokazuju spolni dimorfizam već u ranim fazama (Bortolotti 1984, Masterov 2000, Shephard i sur. 2004). Spol

ptica može se odrediti na osnovu: (1) ponašanja tijekom parenja, (2) pojave ogoljene kože kod sjedenja na jajima, (3) pregledavanje spolnih žlijezda laparotomijom ili laparoskopijom, (4) određivanjem spolnih kromosoma te (5) razlikama u morfometrijskim osobinama (Dubiec i Zagalska-Neubauer, 2005).

1.3 Morfometrijske metode određivanja spola

Budući da su ženke orlova relativno veće od mužjaka jedna od mogućih metoda određivanja spola je i mjerenje morfometrijskih obilježja tj. mjerenje debljine zastopalja (tarzus) (Helander, 1981). Ovo mjerenje uzima u obzir relativno veću debljinu tarzusa kod ženki u odnosu na mužjake u mladih orlova. Mjerenje može lako izvesti jedna osoba tijekom prstenovanja te se prstenovanje provodi dok mladi nemaju sposobnost leta. Do sada je provedeno nekoliko sličnih istraživanja orla štekavca u kojima su mjerene različite morfometrijske osobine, no mjerenje debljine tarzusa se ispostavilo kao najučinkovitija metoda određivanja spola na terenu (Helander i sur., 2007).

1.4 Molekularno određivanja spola pomoću *CHD* gena

Za razliku od sisavaca, kod ptica spol određuju Z i W kromosom. Ženke su heterogametne i imaju genotip ZW, dok su mužjaci homogametni i imaju genotip ZZ (Ohno, 1967). Zbog različitog izgleda ovi su kromosomi pogodni za citološko određivanje spola (Fridolffson i sur., 1998). Osim citoloških postoje i različite molekularne metode određivanja spola iz genomske DNA koje se temelje na različitim sekvencama Z i W kromosoma. Najjednostavnija i najučinkovitija je metoda određivanja spola pomoću *CHD* gena (chromo-helicase-DNAbinding gene). Nalazimo ga u dvije varijante: *CHD-Z* gen koji je vezan za Z kromosom kod mužjaka i *CHD-W* gen koji se nalazi na W kromosomu kod ženki (Friddolffson i Ellegren, 1999; Griffiths i sur., 1998). Uz pomoć početnica (2550F/2718R) se lančanom reakcijom polimeraze (PCR) umnože fragmenti CHD-W i CHD-Z gena te se nakon gel-elektroforeze dobije jedan fragment ukoliko je jedinka bila mužjak ili dva fragmenta ukoliko je jedinka bila ženka (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).

1.5. Cilj rada

Ciljevi ovog rada su:

1. Odrediti spol na temelju morfometrijskih obilježja - mjerenje debljine zastopalja.

2. Odrediti spol pomoću *CHD* gena.

3. Usporediti učinkovitost određivanja spola pomoću morfometrijskih obilježja i pomoću *CHD* gena u ptića orla štekavca.

2. Materijali i metode

2.1. Uzorkovanje materijala za izolaciju DNA

Kao materijal iz kojega se izolirala DNA, poslužila su konturna pera ptića orlova uzeta s područja prsa koja nemaju ulogu pri letu. Pera su se prikupljala za vrijeme prstenovanja. Ptići se prstenuju prije nego nauče letjeti, te nakon što su dovoljno odrasli kako ih prstenovanje ne bi ozlijedilo ili uznemiravalo. Prstenovanje orlova provodi se u periodu od dva tjedna, obično od 24. travnja do 9. svibnja kada su ptići stari između 4 i 8 tjedana. Uzorci pera prikupljeni 2016. godine su prikupljeni ranije od 18.-24. travnja zbog ranijeg početka sezone gniježđenja koja je uzrokovana blagom zimom. Materijali prikupljeni 2017. godine prikupljeni su u uobičajenom periodu od 24. travnja do 9. svibnja u Kopačkom ritu. Ukupno je prikupljeno 30 uzoraka iz 17 gnijezda.

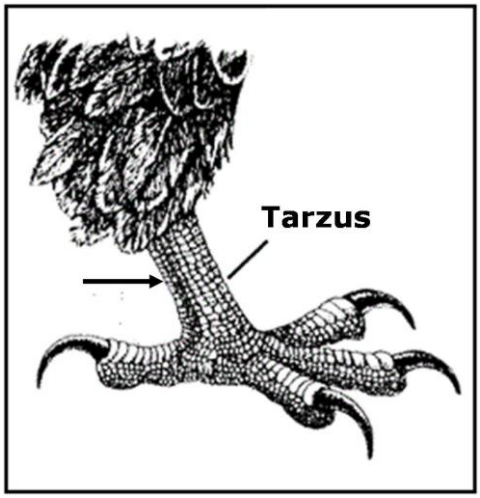
Ptićima su iščupana po dva konturna pera s područja prsa, a zatim su pohranjena u papirnate vrećice, za svakog ptića posebno. Papirnata vrećice slagale su se u plavu omotnicu s oznakom za lokalitet gnijezda iz kojeg ptić potječe, te osobe koja je prstenovala i uzrokovala pera. Također, na omotnici je naveden i datum uzorkovanja i serijski broj prstena kako bi se znalo kojoj jedinki pripadaju. U slučajevima kad bi u gnijezdu bilo više jedinki svaki bi se uzorak pera stavljao u zasebnu vrećicu kako ne bi došlo do međusobne kontaminacije. Sav materijal nakon uzorkovanja čuvan je na sobnoj temperaturi.



Slika 1. Prstenovanje mladih orlova štekavca i prikupljanje materijala za molekularnu analizu (fotografija Tibor Mikuška)

2.2. Morfometrijska mjerenja

Kao parametar uzetje najtanji dio tarzusa (slika 2). Za mjerenje je korišten digitalni kalibarski šestara (kaliper) s preciznošću od 1/100 mm. Za graničnu točku je uzeta debljina tarzusa od 13.8 mm te jedinke koje su imale tarzus manje debljine od 13.5 mm su bile određene kao mužjaci, a jedinke koje su imale tarzus debljine iznad 14 mm su bile određene kao ženke (Helander i sur., 2007).



Slika2. Strelica označava najtanji dio tarzusa na kojem je provedeno mjerenje (web 1).

2.3. Izolacija DNA

Konturna pera ptića pri bazi su prokrvljena i sadrže krvni ugrušak iz kojega je izolacijom moguće dobiti DNA. Svaka baza pera duljine nekoliko milimetara odvojena je od ostatka pera i izrezana sterilnim žiletom na manje komadiće i prebačena u plastičnu kivetu od 2mL. Pri izolaciji tkiva korišten je standardni protokol za izolaciju DNA opisan u (Begović i sur. 2017).

2.4 Lančana reakcija polimerazom(PCR)

Za umnažanje odsječaka *CHD* gena korišten je par početnica 2550F (5'-GTTACTGAT TCGTCTACGAGA-3') i 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') (Fridolfsson i sur.,1999).Smjesa za lančanu reakciju polimerazom (PCR) sadržavala je 2xEmerald Mix (TaKaRa, Clontech), 125 nM početnica 30ng/µL genomske DNA u ukupnom volumenu od 20 µL. PCR reakcija odvijala se prema slijedećem protokolu: početna denaturacija na 94°C 5 minuta, 40 ciklusa denaturacije na 94°C 30 sekundi, sparivanje početnica (annealing) na 55°C

1 minuta, produživanje lanaca 2 minuta na 72°C te završno produljivanje lanca na 72°C u trajanju od 7 minuta.

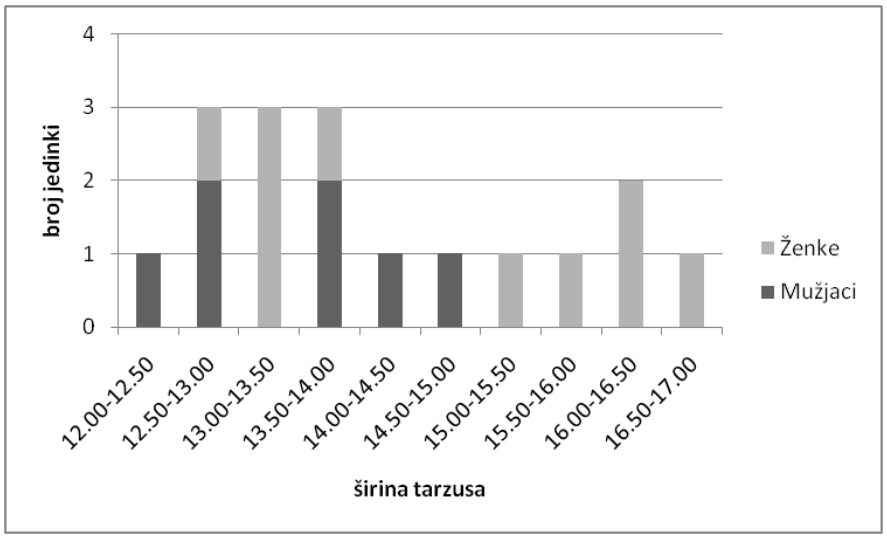
2.5 Gel elektroforeza

Nakon PCR reakcije uzorci su naneseni na 2% agaroznigel u TAE puferu (Tris-acetat EDTA, pH=8,0). Za određivanje veličine DNA odsječaka korišten je 50kb DNA marker (Sigma-Aldrich), a gel se bojao sa SYBR®SafeDNA gel stain (Invitrogen). Elektroforeza se provodila tijekom 35-40 minuta na 100 V. DNA odsječci su vizualizirani pomoću UV transiluminatora, fotografirani i obrađeni pomoću Kodak 1D 3.6 programa (Kodak).

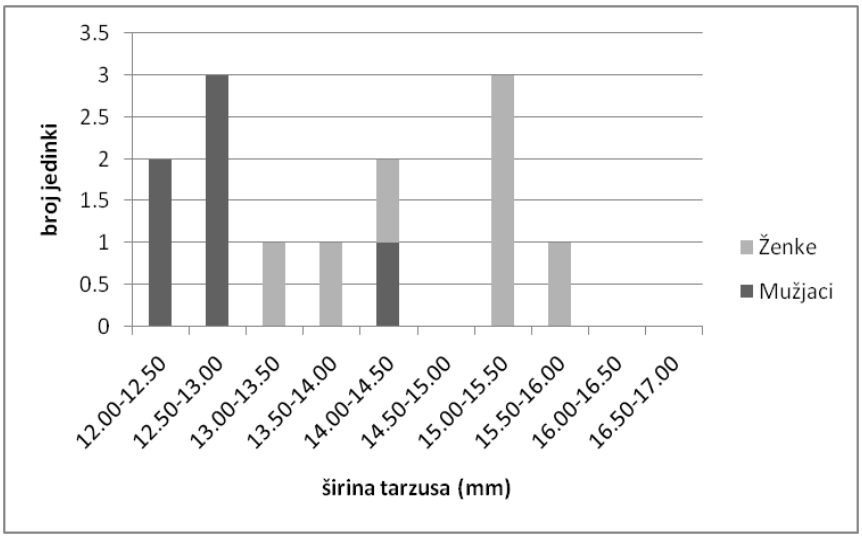
3. Rezultati

3.2. Debljina tarzusa kod mužjaka i ženki

Ukupna prosječna vrijednost debljine tarzusa u mužjaka za obje godine uzorkovanja iznosila je 13.16 mm, median je iznosio 12.84 mm te standardna devijacija 0.77. Ukupna prosječna vrijednost debljine tarzusa u ženki za obje godine uzorkovanja iznosila je 14.7 mm, median je iznosio 15.09 mm te standardna devijacija 1.23. Mužjaci su imali debljinu tarzusa između 12.19-14.74 mm dok su ženke imale debljinu tarzusa između 12.83-16.77 mm (slika 3 i 4).



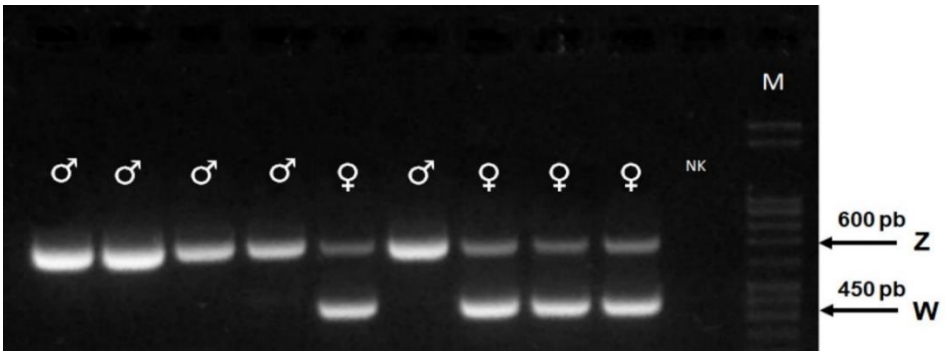
Slika 3. Raspodjela spolova u zavisnosti o debljine tarzusa kod ptića orla štekavca u 2016. godini



Slika 4. Raspodjela spolova u zavisnosti o debljine tarzusa kod ptića orla štekavca u 2017. godini.

3.2. Usporedba morfometrijskog i molekularnog određivanja spola

Molekularno određivanje spola izvedeno je pomoću spolno specifičnih početnica za umnažanje *CHD* gena 2550F/2718R. Pomoću lančane reakcije polimerazom dobiveni su umnoženi fragmenti veličine 450pb *CHD-W* (W kromosom) i 600pb *CHD-Z* (Z kromosom). Uzorci koji sadrže jedan fragment *CHD-Z* su mužjaci (genotip ZZ), a uzorci koji sadrže dva fragmenta *CHD-Z* i *CHD-W* su ženke (genotip ZW)(slika 5).



Slika 5. Molekularno određivanje spola kod ptića orla štekavca na temelju umnažanja odsječaka *CHD* gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Za određivanje spola korištene su početnice 2550F/2718R koje daju gena *CHDZ* (600 pb) kod mužjaka i dva odsječka gena *CHDZ i CHDW* (600 i 450pb) kod ženki. Oznaka NK označava negativnu kontrolu, oznaka M označava molekularni marker.

U 2016. godini uzorkovano je ukupno 17 jedinki orla štekavca. Na temelju debljine tarzusa, od ukupno 17 jedinki 8 ih je imalo tarzus debljine ispod granične vrijednosti od 13.5 mm (mužjaci) te 7 jedinki iznad 14 mm (ženke). Dvije jedinke su imale tarzus debljine 13.79 mm i 13.84 mm što daje dvojbene rezultate (tablica 1.).

Rezultati molekularnog određivanja spola u 2016. godini pokazali su kako su od ukupno 17 jedinki 7 jedinki bili mužjaci, a 10 jedinki ženke (tablica 1).

Tablica 1. Usporedba rezultata morfometrijskog i molekularnog određivanja spola ptića orla štekavca u 2016. godini. Slovo M označava muški spol, slovo Ž označava ženski, oznaka X označava jedinke kojima nije bilo moguće odrediti spol na temelju mjerenja debljine tarzusa.

Broj prstena i godina uzorkovanja	**Debljina tarzusa (*mm*)**	**Spol na temelju debljine tarzusa**	**Spol na temelju *CHD* gena**
U 122 /2016	13.79	X	M
U 123 /2016	12.8	M	M
U 125 /2016	12.44	M	M
U 126 /2016	16.44	Ž	Ž
U 127 /2016	14.74	Ž	M
U 128 /2016	13.39	M	Ž
U 129 /2016	12.83	M	Ž
U 130 /2016	16.01	Ž	Ž
U 131 /2016	14.04	Ž	M
U 132 /2016	16.77	Ž	Ž
U 133 /2016	13.41	M	Ž
U 134 /2016	13.54	M	M
U 135 /2016	15.24	Ž	Ž
U 136 /2016	13.26	M	Ž
U 137 /2016	15.57	Ž	Ž
U 138 /2016	13.84	X	Ž
U 139 /2016	12.84	M	M

U 2017. godini uzorkovano je 13 jedinki orla štekavca. Od ukupno 13 jedinki 6 ih je imalo tarzus debljine ispod granične vrijednosti od 13.5 mm (mužjaci) te 6 jedinki iznad 14 mm (ženke). Jedna jedinka je imala tarzus debljine 13.94 mm (tablica 2).

Rezultati molekularnog određivanja spola u 2017. godini pokazali su da od ukupno 13 jedinki 6 jedinki su bili mužjaci, a 7 jedinki ženke.

Tablica 2. Rezultati morfometrijskog i molekularnog određivanja spola ptica. Polja obojana sivom pokazuju rezultate koji se podudaraju u obje metode. Slovo M označava muški spol, slovo Ž označava ženski, oznaka X označava jedinke kojima nije bilo moguće odrediti spol na temelju mjerenja širine tarzusa.

Broj prstena i godina uzorkovanja	**Veličina tarzusa (*mm*)**	**Spol na temelju veličine tarzusa**	**Spol na temelju *CHD* gena**
U 140 /2016	14.04	Ž	M
U 161 /2016	15.7	Ž	Ž
U 162 /2016	12.62	M	M
U 163 /2016	15.09	Ž	Ž
U 164 /2016	13.97	X	Ž
U 165 /2016	12.9	M	M
U 166 /2016	15.41	Ž	Ž
U 167 /2016	15.34	Ž	Ž
U 168 /2016	13.46	M	Ž
U 169 /2016	12.5	M	M
U 170 /2016	12.69	M	M
U 171 /2016	14.09	Ž	Ž
U 172 /2016	12.19	M	M

4. Rasprava

Rezultati morfometrijskog određivanja spola pokazuju razliku u debljini tarzusa između spolova. U 2016. godini razlika između prosječne debljine tarzusa je 1.2 mm dok je u 2017.godini znatno veća i iznosi 1.9 mm. Mladi orla štekavca, muškog spola, u prosjeku imaju manji tarzus od ženki za 1.54 mm. Vrijednost u kojima su se preklapale veličine debljine tarzusa oba spola su se kretale u rasponu od 12.8-14.8 mm, što bi značilo da sve jedinke koje imaju debljinu tarzusa ispod 12.8 mm su mužjaci, a sve jedinke koje imaju debljinu tarzusa iznad 14.8 mm su ženke (slika 3 i 4).

Slično istraživanje provedeno je na dvije različite populacije orla štekavca, jedne iz Laponije (sjever Švedske) i s juga Švedske (Helander i sur., 2007). Rezultati morfometrijskih mjerenja pokazali su da ne postoji razlika u debljini tarzusa između mužjaka populacije na jugu i sjeveru Švedske, za razliku od ženki. Autori su pretpostavili da je razlog tomu ograničena količina hrane kojom raspolaže laponijska populacija (Helander i sur., 2007). Mužjaci populacije orla štekavca u Hrvatskoj imaju veću prosječnu debljinu tarzusa (13.17 mm) nego populacije u Švedskoj (12.3 i 12.8 mm). Prosječna debljina tarzusa u ženki se ne razlikuje (14.7 mm) od populacije na jugu Švedske (14.8 mm), ali se razlikuje od ženki laponijske populacije (13.2 mm). Raspon preklapanja debljine tarzusa oba spola u populacijama orlova iz Švedske manji je nego raspon izmjeren u hrvatskoj populaciji. Jedan od mogućih uzroka šireg raspona preklapanja debljine tarzusa u hrvatskim populacijama je mali broj uzoraka na kojem je provedeno ovo istraživanje.

Uzevši u obzir graničnu vrijednost od 13.8 mm prema (Helander i sur., 2007.) za debljinu tarzusa, kada usporedimo rezultate morfometrijskog i molekularnog određivanja spola ptica, morfometrijska mjerenja pokazala su točnost u određivanju spola za 76% jedinki muškog spola i 70% jedinki ženskog spola (tablica 1 i 2). U istraživanju (Helander i sur.2007) točnost u određivanju spola iznosila je 98% za mužjake i 95% za ženke za populaciju na jugu Švedske dok je za laponijsku populaciju točnost u određivanju spola kod ženki bila 96%, za razliku od mužjaka, gdje je ona iznosila samo 46%. Slabiji postotak u točnosti određivanja spola pomoću morfometrijskih osobina u hrvatskoj populaciji može biti posljedica malog broja uzoraka ili različitih osobina populacije. Također, uzimanjem drugih morfometrijskih obilježja mogla bi se odrediti diskriminanta koja bi ponudila veću točnost u određivanju spola. Budući da je ovo prvo takvo istraživanje, daljnja istraživanja populacije bi mogla dovesti do određivanja granične vrijednosti koja bi bila specifična za populaciju u Hrvatskoj.

Kod morfometrijskih mjerenja javlja se problem preklapanja parametara osobina po kojima se spolovi razlikuju te koji u konačnici daju dvojbene rezultate. U ovom istraživanju nalaze se tri jedinke koje su imale debljinu tarzusa blizu granične vrijednosti (13.8 mm) u rasponu od 13.5 – 14 mm (tablica 1 i 2, vrijednosti označene slovom X). Za jedinku koja je imala debljinu tarzusa manju od granične vrijednosti molekularnim se određivanjem spola ustanovilo da je muškog spola, a za dvije jedinke koje su imale debljinu tarzusa veću od granične vrijednosti molekularnim određivanjem spola ustanovilo se da su ženskog spola, što je u skladu s predloženom graničnom vrijednosti od 13.8 mm.

5. Zaključci

1. Morfometrijska mjerenja u određivanju spola mogu poslužiti kao brza i jednostavna metoda određivanja spola na terenu kod ptića orla štekavca.

2. Mladi mužjaci u istraživanoj populaciji imaju manji tarzus (12,8 mm) od ženki (14,8 mm).

3. Uspješnost točnog određivanja spola mjerenjem debljine tarzusa, u usporedbi s molekularnom determinacijom, iznosi 76% za mužjake i 70% za ženke.

4. Trima jedinkama nije bilo moguće odrediti spol na temelju mjerenja debljine tarzusa već samo na temelju molekularne analize.

5. Molekularnom analizom određen je spol kod svih jedinki.

6. Literatura

Ansari, H., Takagi N., Sasaki M. (1988) Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. Cytogenetic and Genome Research 47: 185-188.

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.

Bortolotti, G. R. (1984) Sexual size dimorphism and age-related size variation in Bald Eagles. Journal of Wildlife Management 48:72-81.

BirdLife International 2017.Speciesfactsheet: *Haliaeetus albicilla*. Down loaded from http://www.birdlife.org on 22/09/2017.

Donohue, K.C., Dufty, A.M.Jr. (2006) Sex determination of Red-tailed Hawks (Buteo jamaicensis calurus) using DNA analysis and morphometrics. Journal of Field Ornithology 77:74-79.

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

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

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. Proceedings of the National Academy of Sciences 95: 8147–8152.

Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., Dawson, R. J. G. (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 Sciences 90:8324-8326.

Helander, B. (1981) Nestling measurements and weights from two White-tailed Eagle populations in Sweden. Bird Study 28:235–241.

Helander, B., Hailer, F., Vila, C. (2007) Morphological and genetic sex identification of white-tailed eagle *Haliaeetus albicilla* nestlings. Journal od Ornithology 148:435-442.

Mikuška, T. (2013) Štekavac, White – tailed Eagle *Haliaeetus albicilla* L 1758. U: 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, str. 215-216.

Radović, A., Mikuška, T. (2009) Population size, distribution and habitat selection of the white-tailed eagle *Haliaeetus albicilla* in the alluvial wetlands of Croatia. Biologia 61:1-9.

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

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

Web izvor

Web 1. http://www.friendsofblackwater.org/eagle_cam_blog/eagle_foot.gif