

---

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

# Tehnici comparative de sexare a păsărilor care nu prezintă dimorfism sexual

---

Doctorand **Maria-Carmen TURCU**

---

Conducători de doctorat **Prof. univ. dr. Dana Liana PUSTA**  
**Prof. univ. dr. Liviu Ioan OANA**

---



## I. INTRODUCERE

Determinarea sexului la păsari se poate face prin mai multe metode, acestea fiind reprezentate de metodele tradiționale, metodele chirurgicale, metodele genetice, metodele hormonale (determinarea hormonilor steroizi) și metodele ecografice (la nivelul aparatului genital) (Fig. 1) (O'Malley, 2005; Stanford, 2010).

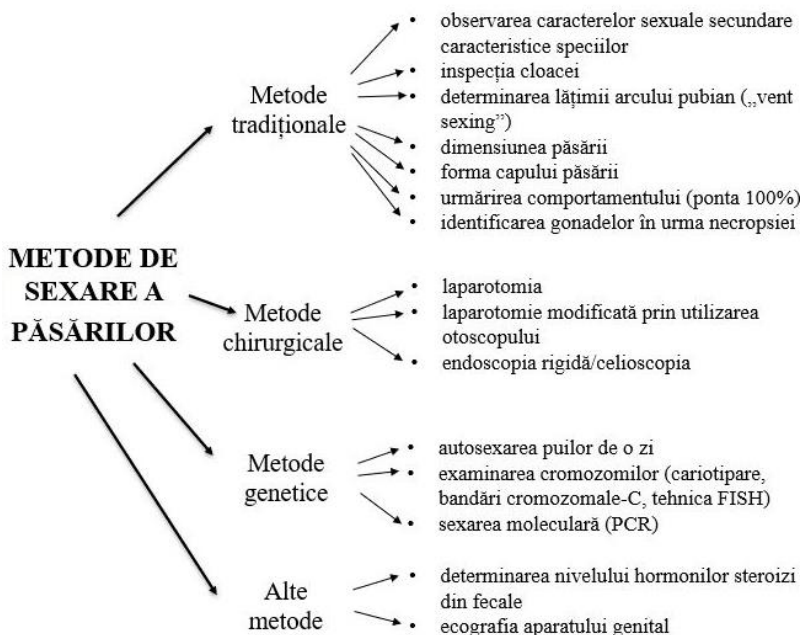


Fig. 1 Schema metodelor de sexare la păsări (original)

**Ipoteza de lucru** a fost reprezentată de faptul că majoritatea păsărilor nu prezintă dimorfism sexual, iar stabilirea corectă a sexului are numeroase aplicații în medicina comportamentală, în medicina conservativă, în managementul păsărilor sălbatice, în reproducția diferitelor specii de păsări, în îmbunătățirea programelor de reproducție a păsărilor aflate în captivitate, în analiza strategiilor de reproducție a păsărilor de curte, în studiile evoluționiste sau în medicina legală.

**Obiectivele** cercetării au fost reprezentate de sexarea păsărilor prin metode chirurgicale (sexarea endoscopică), metode genetice (sexarea moleculară) și metode tradiționale (identificarea gonadelor în urma necropsiei), precum și compararea acestor tehnici.

Sexarea endoscopică a fost realizată cu ajutorul metodelor chirurgicale. Studiul a fost realizat pe cadavre de Porumbel Domestic (*Columba livia domestica*), având ca obiectiv identificarea gonadelor și compararea rezultatelor cu cele obținute în urma necropsiei, pentru a evalua acuratețea acestor tehnici.

Obiectivul principal al studiilor genetice a fost identificarea sexului la păsări prin tehnici de genetică moleculară (PCR). Metodele genetice de sexare a păsărilor s-au bazat pe identificarea genei CHD (cromodomain helicase DNA binding protein), genă bine conservată la nivelul cromozomilor sexuali ai păsărilor (CHD1Z și CHD1W). Pentru sexarea moleculară a păsărilor au fost comparate mai multe tipuri de probe recoltate prin metode invazive (sânge), minim invazive (tampon oral, pene smulse) și non-invazive (pene năpârlite). De asemenea, au fost comparate mai multe tehnici de pre-liză și extracție a ADN-ului, precum și mai multe protocoale de amplificare a ADN prin reacție PCR la diferite specii de păsări non-ratite (salbatice și de companie).

În final s-au realizat studii comparative privind cele trei tehnici utilizate, sexarea endoscopică, moleculară și necropsică la Porumbelul Domestic (*Columba livia domestica*). De asemenea, sexarea endoscopică a fost comparată cu cea moleculară la Papagalul Amorez (*Agapornis spp.*).

## II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Capitolul Contribuția personală din teza intitulată „**Tehnici comparative de sexare a păsărilor care nu prezintă dimorfism sexual**” cuprinde nouă studii a căror obiectiv principal a fost identificarea sexului la păsări prin tehnici chirurgicale, de genetică moleculară și necropsice.

### 1. Sexarea endoscopică la Porumbelul Domestic (*Columba livia domestica*)

Obiectivul principal al acestui studiu a fost compararea tehnicii de sexare endoscopică cu tehnica necropsiei la Porumbelul Domestic (*Columba livia domestica*) pentru identificarea gonadelor, în vederea evaluării acurateței acestor tehnici.

În acest studiu a fost inclus un număr de 21 de porumbei. Materialele necesare pentru metoda endoscopiei au fost reprezentate de echipamentul laparoscopic Karl Storz® Veterinary Endoscopy America Inc., sursa de lumină cu xenon, camera turnului de laparoscopie, monitor, telescop de 2.7 mm și instrumentar chirurgical.

Concluzii:

1. Dintre cele două metode de sexare, necropsia (81%) s-a dovedit a fi mai eficientă decât sexarea endoscopică (71%) la Porumbelul Domestic (*Columba livia domestica*).
2. Sexarea endoscopică a avut eficiența mai scăzută din cauza vizibilității reduse la nivelul cavității celomice (produse de hemoragia intracelomică sau celomita cu aderențe).
3. Experiența examinatorului joacă un rol important în sexarea cu succes a păsărilor prin tehnica celioscopiei prin abord lateral stâng.
4. Juvenilii nu au putut fi sexați prin niciuna dintre cele două metode deoarece prezintă gonade de mici dimensiuni slab diferențiate.

## 2. Studiu comparativ preliminar privind tipurile de probe recoltate de la păsări prin metode invazive, minim invazive și non-invazive în vederea sexării moleculare

Obiectivul principal al acestui studiu a fost identificarea genelor CHD (cromodomain helicase DNA binding protein) de la nivelul cromozomilor sexuali ai păsărilor (Z și W), prin tehnica PCR, utilizând diverse probe de țesuturi colectate de la două specii de păsări de companie (cadavre de *Melopsittacus undulatus* și păsări vii *Gallus gallus domesticus*) care prezintă dimorfism sexual. Obiectivul secundar a fost determinarea tipurilor de probe, recoltate prin metode invazive, minim invazive și non-invazive, care se pretează cel mai eficient pentru extracția ADN-ului și sexare moleculară.

Materialele necesare pentru sexarea moleculară au fost împărțite în materiale necesare recoltării probelor, materiale necesare prelucrării probelor și aparatura din Laboratorul de Genetică Moleculară. Sexarea genetică moleculară a păsărilor prin tehnica PCR a presupus următoarele etape: recoltarea probelor, depozitarea probelor, extracția ADN-ului cu kit-uri comerciale, cuantificarea ADN-ului cu spectrofotometrul NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, ME), amplificarea ADN-ului cu ThermoCycler C1000TM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California), electroforeza în gel de agaroză, examinarea fragmentelor de ADN cu transiluminatorul BioDoc-It image system (Bio-Rad Laboratories) și interpretarea rezultatelor.

În cadrul acestui studiu au fost incluse două perechi de păsări (4 indivizi) din speciile *Melopsittacus undulatus* și *Gallus gallus domesticus*. A fost folosit kit-ul Isolate II Genomic DNA (Meridian Bioscience, London, UK) pentru extracția ADN-ului și un protocol PCR clasic descris de Griffiths și colab. (1998), folosind primerii P2/P8.

La Peruș (*Melopsittacus undulatus*) a fost obținută o concordanță de 100% între rezultatele obținute în urma sexării moleculare și cele obținute în urma examenului necropsic. Toate probele de țesut luate în studiu de la peruși (sânge, pene, tampon oral, piele, intestin, miocard, testicul) au furnizat un ADN calitativ și cantitativ pentru a putea identifica sexul păsărilor. La găină și cocoș (*Gallus gallus domesticus*) rezultate concludente am obținut doar la individul de sex masculin, în timp ce la femelă nu a putut fi confirmat sexul prin metode moleculare (Fig. 2).

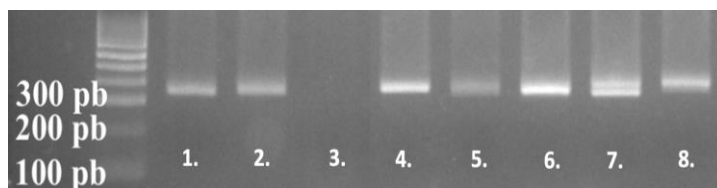


Fig. 2 Sexarea ADN prin PCR folosind primerii P2 și P8 (original)

**Legendă:** 1., 2. *Gallus gallus domesticus*, mascul, pene; 3. *G. g. domesticus*, femelă, pene; 4. *Melopsittacus undulatus*, mascul, sânge; 5. *M. undulatus*, mascul, tampon oral; 6. *M. undulatus*, mascul, ficat; 7. *M. undulatus*, femelă, tampon oral; 8. *M. undulatus*, mascul, pene.

Concluzii:

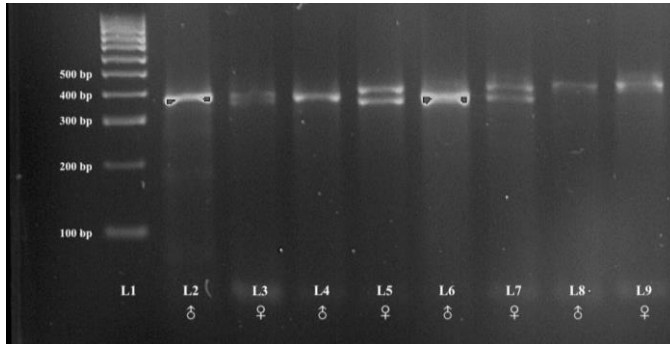
1. Concentrația ADN-ului obținut de la cadavre a fost cea mai ridicată în probele provenite din ficat (181,1 ng/μl), testicul (163,9 ng/μl) și intestin (96 ng/μl), urmate de probele de sânge (21,3 ng/μl), tampoane orale (19,9 ng/μl) și pene (4,4 ng/μl).
2. Denaturarea prealabilă a penelor cu ajutorul aparatului TissueLyserII, înainte de extracția propriu-zisă a ADN-ului, a dus la obținerea unei concentrații mai ridicate de ADN.
3. Amplificarea ADN-ului din probele de pene nu a putut fi realizată cu succes la toate speciile de păsări de companie testate în acest studiu (*Gallus gallus domesticus* și *Melopsittacus undulatus*), prin urmare recomandăm amplificarea ADN din probe pereche pene-tampon oral de la fiecare pasăre.

### **3. Studiu comparativ al probelor perechi de pene și tampoane orale ca surse de ADN utilizate pentru sexarea moleculară a păsărilor de companie**

Obiectivul principal al acestui studiu a fost compararea rezultatelor sexării moleculare prin PCR din probe pereche de pene (procesate prin șoc mecanic cu ajutorul aparatului TissueLyserII) și tampoane orale, recoltate de la patru specii de păsări de companie: *Psittacula krameri*, *Neophema splendida*, *Agapornis* spp. și *Columba livia domestica*. Obiectivul secundar a urmărit găsirea unei alternative minim invazive pentru prelevarea de probe care să poată fi utilizată pentru sexarea timpurie a păsărilor.

În cadrul acestui studiu au fost incluse 101 păsări de companie aparținând ordinilor *Columbiforme* (*Columba livia domestica*) și *Psittaciforme* (*Psittacula krameri*, *Neophema splendida* și *Agapornis* spp.) A fost folosit kitul Isolate II Genomic DNA; Meridian Bioscience, Newtown, OH, SUA pentru extracția ADN-ului și un protocol PCR clasic descris de Griffiths și colab. (1998), folosind primerii P2/P8.

Rata generală de succes a reacției PCR pentru determinarea sexului a fost semnificativ mai mare din tampoane orale (94,06%) decât din penele prelucrate cu ajutorul aparatului TissueLyserII (82,43%) la *Psittacula krameri*, *Neophema splendida*, *Agapornis* spp. și *Columba livia domestica*. Pentru sexarea moleculară a cadavrelor de Porumbel Domestic, rezultatele cele mai fiabile s-au obținut din probe de cheag cruoric (100%), apoi din pene (95,34%) și în final din tampoane orale (93,02%). La utilizarea probelor de pene, rezultatele au fost scăzute în cazul penelor de contur, de mici dimensiuni cu calamus slab dezvoltat, care prezintă o cantitate redusă de ADN. În schimb, în studiul de față s-au obținut rezultate fiabile chiar și din probe de puf în cazul unui porumbel având vârsta de aproximativ 7 zile. Rezultatele sexării moleculare din probe de pene și probe de tampon bucal (Fig. 3) au fost similare la 78,38% dintre păsările testate.



**Fig. 3** Rezultatele PCR din probele de tamponare orale

**Legendă:** L1 – standard de dimensiune (scara ADN de 100 bp); ♂ - mascul; ♀ - femelă; L2 și L3 *Columba livia domestica*; L4 și L5 *Neophema splendida*; L6 și L7 *Psittacula krameri*; L8 și L9 *Agapornis spp.*

#### Concluzii:

1. Rata de succes a reacției PCR pentru determinarea sexului a fost semnificativ mai mare din probe de tamponare orale (94,06%) decât din probele de pene (82,43%) la speciile teste: *Psittacula krameri*, *Neophema splendida*, *Agapornis spp.* și *Columba livia domestica*.
2. Pentru sexarea moleculară a cadavrelor de Porumbel Domestic, rezultatele cele mai bune au fost obținute din probe de cheag cruoric (100%), apoi din pene (95,34%) și în final din tamponare orale (93,02%).
3. Rata de succes a reacției PCR a fost mai scăzută la păsările juvenile (72,09%) în cazul penelor de contur, de mici dimensiuni cu calamus slab dezvoltat, care prezintă o cantitate redusă de ADN.
4. În studiul de față s-a reușit sexarea din probe de puf în cazul unui porumbel având vârsta de aproximativ 7 zile.
5. Probele de tampon oral au fost eficiente pentru sexarea puilor de papagali proaspăt eclozionați, lipsiți pene, însă în cazul cadavrelor care prezentau leziuni de stomatită și depozite de pseudomembrane în cavitatea orală nu s-a putut izola ADN, probele având o cantitate redusă de celule epiteliale și implicit, de ADN.

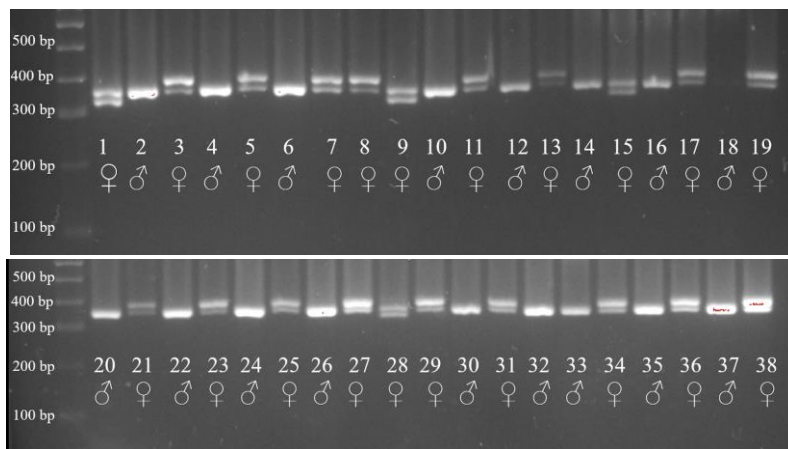
#### 4. Studiu experimental privind recoltarea și conservarea probelor biologice utilizate în vederea sexării păsărilor prin tehnici de genetică moleculară

Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a determina dacă ADN-ul prezent în tamponarele orale și în probele de sânge recoltate pe hârtie de filtru (DBS-„dried blood spots”) se poate conserva dacă acestea sunt păstrate timp de 30 de zile la temperatura camerei (20-22 °C). Scopul acestui studiu este de a facilita condițiile de transport și depozitare a probelor până la prelucrare. Obiectivul secundar a fost compararea concentrației ADN-ului din sângele recoltat pe anticoagulant cu picături de sânge uscate pe hârtie de filtru (DBS), pentru a găsi o alternativă mai eficientă pentru depozitarea

sângelui. De asemenea, prezentul studiu compară cantitățile de ADN obținute din picăturile de sânge proaspăt prelevate pe hârtie de filtru cu picăturile standard de 20  $\mu$ l de sânge cu anticoagulant prelevate pe hârtie de filtru.

În cadrul acestui studiu au fost incluși 4 indivizi aparținând a trei specii de păsări de companie (*Columba livia domestica*, *Psittacula krameri* și *Psittacus erithacus*). A fost folosit kit-ul DNeasy Blood & Tissue, Qiagen pentru extracția ADN-ului și un protocol PCR clasic descris de Ito și colab. (2003), folosind primerii P2/NP.

Extracția ADN-ului din probe de tamponare orale și DBS păstrate la temperatura camerei s-a realizat în ziua 0, 1, 2, 4, 7, 14 și 30. Benzile rezultate au avut aceeași intensitate în ziua 0 precum în ziua 30 (Fig. 4).



**Fig. 4** Rezultatele PCR ale celor 38 de probe incluse în studiul de față au identificat la masculi o singură bandă, iar la femele două benzi (original)

#### Concluzii:

1. În urma cuantificării, cea mai mare cantitate de ADN a fost identificată în probele de sânge integral ( $45.05 \pm 0.49$  ng/ $\mu$ l), urmate de probele de sânge cu anticoagulant plasat sub formă de picătură standard de 20  $\mu$ l pe hartie de filtru ( $25.8 \pm 5.02$  ng/ $\mu$ l), apoi de probele de sânge proaspăt recoltat sub formă de picătură direct pe hartie de filtru ( $16.21 \pm 5.40$  ng/ $\mu$ l), iar în final, cea mai mică cantitate de ADN a fost identificată în probele de tampon oral ( $12,52 \pm 3,07$  ng/ $\mu$ l).
2. Concentrația ADN-ului rezultată din probele de sânge recoltate sub formă de picătură direct pe hartie de filtru a variat în funcție de dimensiunea picăturilor recoltate (10,81-21,61 ng/ $\mu$ l).
3. Cuantificarea ADN-ului obținut din diferite tipuri de probe s-a dovedit a fi esențială în optimizarea protocolului PCR, astfel încât 100 ng/ $\mu$ l de ADN sunt necesare unei reacții PCR de succes.

4. Rata de succes a reacției PCR pentru determinarea sexului a fost 100% din sânge integral, picăturile de sânge uscat și din tampoanele orale.
5. Au fost identificate diferențe în ceea ce privește migrarea benzilor în funcție de specie la femele. Benzile de la femelele Porumbel Domestic au migrat la aproximativ 300-350 bp, față de cele de la femelele de *Psittacine* (*Psittacula krameri* și *Psittacus erithacus*) care au migrat la aproximativ 350-400 bp.
6. Prezentul studiu dovedește că transportul și depozitarea DBS- „picăturilor de sânge uscate pe hartie de filtru” și a tampoanelor orale la temperatura camerei, timp de 30 de zile, nu produce repercursiuni asupra calității ADN-ului necesar pentru testele genetice de sexare a păsărilor.

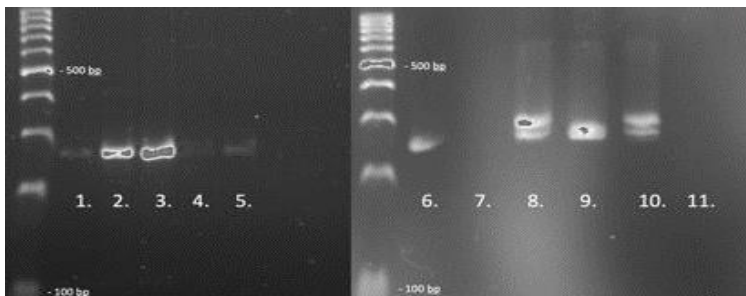
## **5. Tehnici comparative de extracție a ADN-ului din probe recoltate pentru sexarea păsărilor**

Obiectivul principal al acestui studiu a fost sexarea păsărilor de companie prin tehnici de genetică moleculară din diverse probe de țesuturi (sânge, pene, tampoane orale, ficat, piele, intestin, miocard, testicul) colectate de la găină și cocoș (*Gallus gallus domesticus*), Papagal Gri African (*Psittacus erithacus*), Papagal Ara cu Pieptul Galben (*Ara ararauna*) și cadavre de Peruș (*Melopsittacus undulatus*). Obiectivele secundare ale acestui studiu au fost stabilirea unui protocol de pre-liză/denaturare a probelor de pene în vederea obținerii unei cantități și calități de ADN optime pentru amplificare prin reacția PCR, precum și testarea a doua kit-uri comerciale de extracție a ADN-ului.

Calamusul penelor a fost tăiat în bucăți mici de 2-4 mm și apoi a fost prelucrat prin diferite tehnici înainte de protocolul de extracție: 1) pene tăiate cu bisturiul; 2) pene tăiate și apoi mojarate; și 3) penele tăiate și apoi supuse unui șoc mecanic prin agitare la mare viteză cu bile de oțel inoxidabil cu ajutorul aparatului TissueLyserII (Qiagen, SUA). ADN-ul a fost extras conform protocolului recomandat de către producător utilizând două kit-uri comerciale (Izolate Genomic DNA kit; Bioline Reagents Limited, London, U.K.; Patho Gene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit, Intron). Pentru cuantificarea spectrofotometrului ADN a fost folosit NanoDrop ND-1000.

În cadrul acestui studiu au fost incluși 6 indivizi aparținând a patru specii de păsări de companie (*Gallus gallus domesticus*, *Melopsittacus undulatus*, *Psittacus erithacus* și *Ara ararauna*). A fost folosit un protocol PCR clasic descris de Griffiths și colab. (1998), folosind primerii P2/P8 (Fig. 5).





**Fig. 5** Sexarea moleculară prin PCR folosind primerii P2 și P8 (original)

**Legendă:** 1. *Melopsittacus undulatus*, mascul, sânge; 2. *M. undulatus*, mascul, tampon oral; 3. *M. undulatus*, mascul, ficat; 4. *M. undulatus*, femelă, tampon oral; 5. *M. undulatus*, mascul, pene; 6. *Gallus gallus domesticus*, mascul, pene; 7. *G. g. domesticus*, femelă, pene; 8. *Psittacus erithacus*, femelă, pene; 9. *Ara ararauna*, mascul, pene; 10. *P. erithacus*, femelă, tampon oral; 11. *A. ararauna*, mascul, sânge.

#### Concluzii:

1. Toate probele de țesut studiate, recoltate atât de la cadavre de păsări (sânge, pene, piele, intestin, cord, testicul), cât și de la păsări în viață (sânge, pene, tampon oral) pot fi utilizate pentru a identifica sexul păsărilor monomorfe.
2. Pentru extracția ADN-ului din probe de țesut provenite de la pasări recomandăm utilizarea kit-ului Isolate II Genomic DNA, Bioline, datorită eficienței dovedite în prezentul studiu.
3. Pentru pene, concentrația de ADN cea mai ridicată s-a obținut prin denaturarea mecanică cu ajutorul aparatului TissueLyserII, urmate de denaturarea prin mojarare și cea mai puțin eficientă metodă de extracție a fost prin secționare cu bisturiul.
4. Amplificarea ADN-ului a fost realizată cu succes din probele de sânge, tampon oral, pene și ficat la *Melopsittacus undulatus*; din probele de tampon oral și pene la *Psittacus erithacus*; și din probele de pene la *Ara ararauna* și la masculul *Gallus gallus domesticus*. Nu s-a putut realiza amplificarea ADN-ului din probele de sânge la *Ara ararauna* (cadavre autolizate) și din probele de pene la femela *Gallus gallus domesticus*, (pene cu calamus de mici dimensiuni), astfel că recomandăm amplificarea ADN din probe de tampon oral.

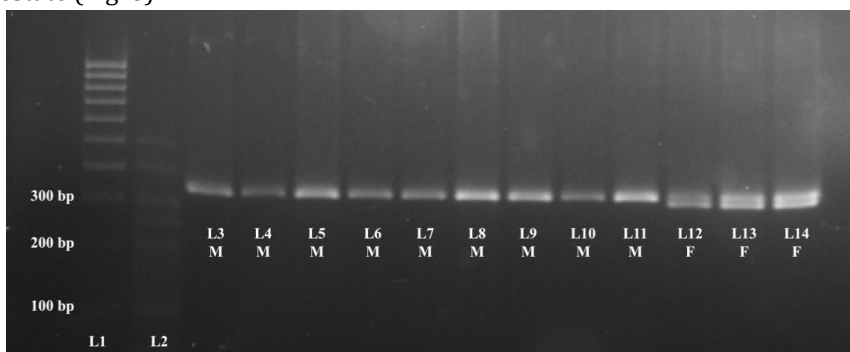
#### 6. Tehnici comparative de amplificare a ADN-ului în vederea sexării păsărilor

Obiectivul acestui studiu a fost compararea a trei tehnici de amplificare a ADN-ului și stabilirea unui protocol de amplificare optim a ADN-ului pentru identificarea sexului păsărilor de companie. Probe de pene, tampon oral și sânge (DBS) au fost recoltate de la păsări aparținând ordinilor *Psittaciformes* (*Ara ararauna*, *Psittacus erithacus* și *Psittacula krameri*) și *Columbiformes* (*Columba livia domestica*). Două dintre protocoale testate au fost PCR convențional, folosind primeri P2 și P8 (Griffiths și colab.,

1998), respectiv P2 și NP (Ito și colab., 2003), în timp ce al treilea protocol a fost PCR multiplex folosind primeri P0, P2 și P8 (Han și colab., 2009).

În cadrul acestui studiu au fost incluși 8 indivizi aparținând ordinilor *Psittaciformes* (*Ara ararauna*, *Psittacus erithacus* și *Psittacula krameri*) și *Columbiformes* (*Columba livia domestica*). Extracția ADN-ului a fost efectuată utilizând kit-ul Isolate II Genomic DNA kit; Meridian Bioscience, SUA.

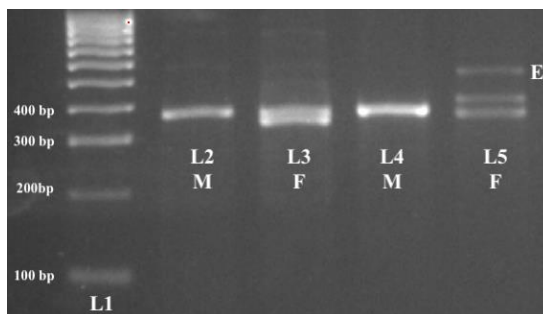
Prezentul studiu a demonstrat că toate cele trei protocele PCR pot fi utilizate pentru sexarea moleculară a ordinilor *Psittaciformes* (*Ara ararauna*, *Psittacus erithacus* și *Psittacula krameri*) și *Columbiformes* (*Columba livia domestica*). Producții PCR au prezentat două benzi la femele (corespunzătoare genelor CHD1-W și CHD1-Z) și o singură bandă la masculi (corespunzătoare genei CHD1-Z), la toate cele trei protocele PCR testate (Fig. 6).



**Fig. 6** Gel PCR de la *Columbiformes* folosind protocolul 2 (original)

**Legendă:** L1 – standard de dimensiune (scara ADN de 100 bp); L2 – standard de dimensiune (scara ADN 25-bp); L3, L6, L9, L12 – tampon oral; L4, L7, L10, L13 – pene; L5, L8, L11, L14 – pete de sânge uscat; M – mascul; F – femelă.

În prezentul studiu a fost identificată la femela *Psittacula krameri* o bandă suplimentară, aceasta fiind produsul amplificării perechii de primeri P0/P2 (Fig. 7).



**Fig. 7** Gel PCR de la *Columbiformes* și *Psittaciformes* folosind protocolul 3 (original)

**Legendă:** L1 – standard de dimensiune (scara ADN de 100 bp); L2, L3 – *Columba livia domestica*; L4; L5 – *Psittacula krameri*; M – mascul; F – femelă; E – banda suplimentar

Concluzii:

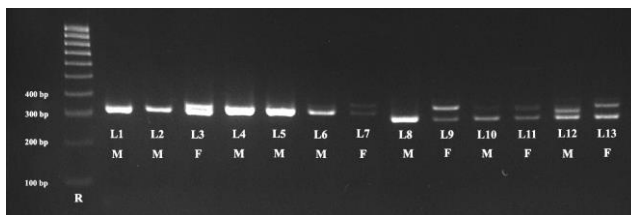
1. S-a realizat cu succes sexarea prin tehnica PCR a păsărilor monomorfe incluse în acest studiu pornind de la probe de pene, tampon oral și DBS.
2. Toate cele trei protocoale PCR pot fi utilizate pentru sexarea moleculară a ordinelor *Psittaciformes* (*Ara ararauna*, *Psittacus erithacus* și *Psittacula krameri*) și *Columbiformes* (*Columba livia domestica*).
3. Recomandăm protocolul care utilizează perechea de primeri P2/NP, descrisă de Ito și colab. (2003), care a oferit cele mai clare benzi la toate speciile testate (*Ara ararauna*, *Psittacus erithacus*, *Psittacula krameri* și *Columba livia domestica*).

## 7. Tehnici de sexare moleculară a speciilor de păsări non-ratite sălbatice și de companie

Obiectivul principal al acestui studiu a fost identificarea sexului prin tehnici de genetică moleculară la păsările sălbatice și de companie aparținând ordinelor *Falconiformes*, *Accipitriformes*, *Galliformes*, *Anseriformes*, *Passeriformes* și *Psittaciformes* folosind tipuri de probe colectate minim-invaziv (tampoane orale și pene) și probe colectate invaziv (sânge integral).

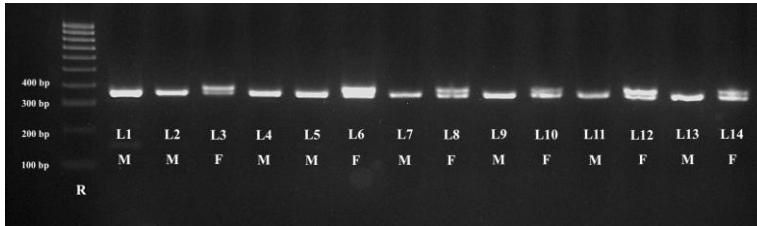
În cadrul acestui studiu au fost incluși 43 de indivizi aparținând ordinelor *Falconiformes*, *Accipitriformes*, *Galliformes*, *Anseriformes*, *Passeriformes* și *Psittaciformes*. Extracția ADN-ului a fost efectuată utilizând kit-ul DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germania).

Prezentul studiu demonstrează aplicabilitatea tuturor tipurilor de probe (pene, tampon oral și sânge) pentru sexarea moleculară a ordinelor de păsări examinate. Primerii P2/NP (Ito și colab., 2003) au fost utilizați pentru sexarea păsărilor din ordinele *Galliformes*, *Anseriformes*, *Passeriformes* (Fig. 8) și *Psittaciformes* (Fig. 9). Deoarece în probele colectate de la *Buteo buteo* (*Accipitriformes*) și *Falco subbuteo* (*Falconiformes*) nu am reușit să identificăm sexul cu ajutorul primerilor P2 și NP (atât la masculi, cât și la femele a apărut o singură bandă), am retestat probele folosind trei primerii P2, NP și MP, conform recomandărilor lui Ito și colab. (2003) (Fig. 10).



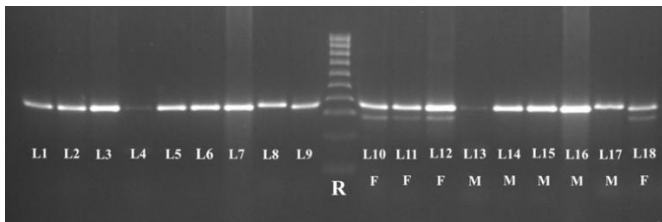
**Fig. 8** Identificarea moleculară a sexului la *Galliformes* (L1), *Anseriformes* (L2, L3) și *Passeriformes* (L4-L13) (original)

**Legendă:** L1 - *Phasianus colchicus*; L2, L3 - *Cygnus cygnus*; L4, L5 - *Taeniopygia castanotis*; L6, L7 - *Chloebia gouldiae*; L8, L9 - *Carduelis cucullata*; L10, L11 - *Carduelis carduelis major*; L12, L13 - *Serinus canaria forma domestica*. Femelele (F) au prezentat două benzi (L3, L7, L9, L11, L13), în timp ce masculii (M) au prezentat o singură bandă (L1, L2, L4-L6, L8, L10, L12)



**Fig. 9** Identificarea moleculară a sexului la *Psittaciformes* (original)

**Legendă:** *Psittaciformes* de talie mare: L1 - *Ara macao*; L2, L3 - *Psittacus erithacus*; L4 - *Cacatua alba*; *Psittaciformes* de talie medie: L5, L6 - *Psittacula krameri*; L7, L8 - *Psephotus haematonotus*; L9, L10 - *Nymphicus hollandicus*; L11, L12 - *Agapornis fischeri*; *Psittaciformes* de talie mică: L12, L13 - *Melopsittacus undulatus*. Femelele (F) au prezentat două benzi (L3, L6, L8, L10, L12, L14), în timp ce masculii (M) au prezentat o singură bandă (L1, L2, L4, L5, L7, L9, L11, L13)



**Fig. 10** Identificarea moleculară a sexului la răpitoare *Accipitriformes* (L1-L8; L10-L17) și *Falconiformes* (L9; L18) (original)

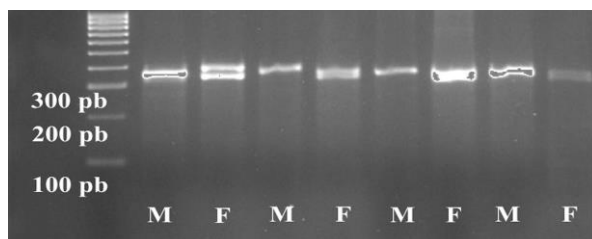
**Legendă:** A fost utilizată perechea de primeri P2/NP – L1-L2. S-a obținut o singură bandă la ambele sexe. A fost utilizată perechea de primeri P2/NP/MP – L10-L18. Femelele (F) au prezentat două benzi (L10-L12, L18), în timp ce masculii (M) au prezentat o singură bandă (L13-L17)

#### Concluzii:

1. Prezentul studiu demonstrează aplicabilitatea tuturor tipurilor de probe (pene, tampon oral și sânge) pentru sexarea moleculară a ordinelor de păsări examinate (*Galliformes*, *Anseriformes*, *Passeriformes*, *Psittaciformes*, *Accipitriformes* și *Falconiformes*).
2. Primerii P2/NP au fost utilizați pentru sexarea păsărilor din ordinele *Galliformes*, *Anseriformes*, *Passeriformes* și *Psittaciformes*.
3. Sexarea moleculară la ordinele *Accipitriformes* (*Buteo buteo*) și *Falconiformes* (*Falco subbuteo*) a putut fi realizată folosind un primer suplimentar, MP, alături de perechea P2/NP.
4. Studiul de față raportează pentru prima dată identificarea moleculară a sexului la Scatiu de Venezuela (*Carduelis cucullata*) și la Sticlete de Cultură (*Carduelis carduelis major*).
5. Recomandăm folosirea probelor recoltate prin tehnici minim invazive precum pene și tamponare orale, în locul utilizării probelor de sânge. De asemenea, recomandăm și testarea ambelor tipuri de probe pentru fiecare specie de pasăre.

## 8. Studiu comparativ de sexare a cadavrelor de Porumbel Domestic (*Columba livia domestica*) prin tehnici endoscopice și de sexare genetică moleculară

Obiectivul principal al acestui studiu a fost compararea tehnicilor de sexare endoscopice cu tehnicile de sexarea moleculară și analiza acurateței acestor tehnici. Obiectivele secundare ale acestui studiu au fost sexarea endoscopică a 25 de cadavre de Porumbel Domestic (*Columba livia domestica*), confirmarea rezultatelor în urma necropsiei cadavrelor, sexarea moleculară prin testarea probelor de tampon oral, pene și cheag cruoric, compararea a două tehnici de extracție a ADN-ului (kit-ul Isolate II Genomic DNA, Bioline și kit-ul DNeasy Blood & Tissue, Qiagen) și două protocele (PCR clasic) de amplificare a ADN-ului, unul folosind primerii P2 și P8 (Griffiths și colab., 1998), iar altul folosind primerii P2 și NP (Ito și colab., 2003) și compararea rezultatelor.



**Fig. 11** Rezultatele sexării moleculare la Porumbelul Domestic identificând la masculi (M) o singură bandă care corespunde genei CHD1Z, iar la femele (F) două benzi care corespund CHD1W și CHD1Z, din probele de tampoane orale, pene și cheaguri cruorice (original)

### Concluzii:

1. Cea mai eficientă metodă de sexare a fost sexarea moleculară (100%), urmată de necropsie (84%) și în final sexarea endoscopică (72%) la Porumbelul Domestic (*Columba livia domestica*).
2. Sexarea endoscopică a avut eficiența cea mai scăzută din cauza experienței mai reduse a examinatorului și a vizibilității reduse la nivelul cavității celomice (produse de hemoragia intracelomică sau celomita cu aderențe).
3. Juvenilii care prezintă gonade de mici dimensiuni slab diferențiate au putut fi sexați doar prin metoda de sexare moleculară.
4. Pentru sexarea moleculară, rezultatele cele mai fiabile s-au obținut din probe de cheag cruoric (100%), apoi tampoane orale (88%) și în final pene (80%).
5. Probele de tampon oral recoltate de la porumbeii care prezentau leziuni de stomatită și depozite de pseudomembrane nu au putut fi amplificate.
6. Chiar dacă probele de sânge s-au dovedit a fi cele mai precise pentru sexarea porumbeilor, tampoanele orale sunt probele minim invazive recomandate de către autori. Această tehnică poate fi aplicată chiar și la puii nou eclozionați și poate reprezenta un instrument foarte util pentru crescătorii de păsări.

## 9. Evaluarea comparativă a două tehnici de sexare, endoscopică și moleculară, la Papagalul Amorez (*Agapornis spp.*)

Obiectivele acestui studiu au fost determinarea sexului la Papagalul Amorez (*Agapornis spp.*) prin două modalități, sexare chirurgicală prin celioscopie și sexare prin testare moleculară din probe de sânge, precum și compararea rezultatelor celor două metode, pentru a evalua acuratețea acestora.

În acest studiu a fost inclus un număr de 42 de indivizi care au fost sexați chirurgical prin celioscopie și sexați genetic prin testare moleculară din probe de sânge.

Concluzii:

1. În urma sexării celor 42 de Papagali Amorezi au fost identificați 26 masculi și 16 femele prin tehnica endoscopiei și 25 masculi și 17 femele prin sexarea moleculară.
2. Luând în considerare acuratețea sexării moleculare la păsări, dovedită în studiile anterioare, susținem că sexarea moleculară este mai precisă decât celioscopia și pentru sexarea Papagalului Amorez (*Agapornis spp.*).

### III. CONCLUZII FINALE ȘI RECOMANDĂRI

Cercetările proprii au avut drept obiective urmărirea a trei direcții de cercetare reprezentate de metode chirurgicale pentru sexarea endoscopică, metode genetice pentru sexarea moleculară și metode tradiționale privind identificarea gonadelor în urma necropsiei, precum și compararea acestor tehnici, organizate în mai multe studii care au generat următoarele concluzii:

1. Tehnica sexării endoscopice a oferit pentru cadavre o acuratețe de 71% comparativ cu 81%, procent întâlnit în cazul necropsiei la Porumbelul Domestic (*Columba livia domestica*). Juvenilii care prezintă gonade slab diferențiate nu au putut fi sexați prin niciuna dintre cele două metode. În urma sexării Papagalilor Amorezi vii, în cazul unui individ s-au obținut rezultate diferite la sexarea endoscopică, unde a fost identificat ca fiind mascul, față de sexarea moleculară, unde a fost identificat ca fiind femelă.
2. Metodele genetice de sexare a păsărilor s-au bazat pe identificarea genei CHD (CHD1Z și CHD1W) prin diverse tehnici PCR pentru următoarele specii de păsări non-ratite: *Agapornis spp.* (ex: *Agapornis fischeri*), *Ara spp.* (2 subspecii: *Ara ararauna* și *Ara macao*), *Buteo buteo*, *Cacatua alba*, *Carduelis spp.* (2 subspecii: *Carduelis carduelis major* și *Carduelis cucullata*), *Chloebia gouldiae*, *Columba livia domestica*, *Cygnus cygnus*, *Falco subbuteo*, *Gallus gallus domesticus*, *Melopsittacus undulatus*, *Neophema splendida*, *Nymphicus hollandicus*, *Phasianus colchicus*, *Psephotus haematonotus*, *Psittacula krameri*, *Psittacus erithacus*, *Serinus canaria forma domestica* și *Taeniopygia castanotis*.
3. Studiul experimental dovedește că transportul și depozitarea DBS (picăturilor de sânge uscate pe hartie de filtru) și a tampoanelor orale la temperatura camerei,

- timp de 30 de zile, nu determină alterări ale calității ADN-ului necesar pentru testele genetice de sexare a păsărilor.
4. Cea mai crescută concentrație de ADN din pene s-a obținut în urma procesării prin șoc mecanic cu aparatul TissueLyserII (Qiagen).
  5. Cuantificarea ADN-ului s-a dovedit a fi esențială în optimizarea protocolului PCR, astfel încât 100 ng/μl de ADN sunt necesare unei reacții PCR de succes.
  6. Au fost testate patru tehnici PCR pentru sexarea păsărilor, astfel:
    - PCR clasic cu primerii P2 și P8 (Griffiths și colab., 1998) la *Agapornis spp.*, *Ara ararauna*, *Columba livia domestica*, *Gallus gallus domesticus*, *Melopsittacus undulatus*, *Neophema splendida*, *Psittacula krameri*, *Psittacus erithacus*;
    - PCR clasic cu primerii P2 și NP (Ito și colab., 2003) la *Agapornis fischeri*, *Ara spp.* (2 subspecii: *Ara ararauna* și *Ara macao*), *Carduelis spp.* (2 subspecii: *Carduelis carduelis major* și *Carduelis cucullata*), *Chloebia gouldiae*, *Columba livia domestica*, *Cygnus cygnus*, *Melopsittacus undulatus*, *Nymphicus hollandicus*, *Phasianus colchicus*, *Psephotus haematonotus*, *Psittacula krameri*, *Psittacus erithacus*, *Serinus canaria forma domestica* și *Taeniopygia castanotis*;
    - PCR multiplex cu primerii P0, P2 și P8 (Han și colab., 2009) la *Ara ararauna*, *Columba livia domestica*, *Psittacus erithacus*, *Psittacula krameri*;
    - PCR multiplex cu primerii P2, NP și MP (Ito și colab., 2003) la *Buteo buteo* și *Falco subbuteo*.
  7. Rata generală de succes a reacției PCR pentru determinarea sexului la păsări a fost semnificativ mai mare din tamponare orale (94,06%), urmate de cea din penele prelucrate cu ajutorul aparatului TissueLyserII (82,43%).
  8. Au fost evidențiate lungimi de migrare ale ampliconilor diferite în funcție de specie. La femelele de Porumbel Domestic au migrat la aproximativ 300-350 bp, față de cele de la femelele de *Psittacine* (*Psittacula krameri* și *Psittacus erithacus*) care au migrat la aproximativ 350-400 bp.
  9. Identificarea moleculară a sexului la Scațiu de Venezuela (*Carduelis cucullata*) și Sticletele de cultură (*Carduelis carduelis major*) nu a fost niciodată raportată până acum în literatura de specialitate.
  10. Studiul comparativ de sexare la Porumbelul Domestic (*Columba livia domestica*) a demonstrat că cea mai eficientă metodă a fost cea moleculară (100%), urmată de necropsie (84%) și în final sexarea endoscopică (72%).

### Recomandări:

1. În vederea sexării moleculare a păsărilor recomandăm utilizarea tamponurilor orale, deoarece este o metodă minim invazivă și se pretează pentru toate categoriile de vârstă, inclusiv pui proaspăt eclozionați lipsiți de pene.
2. Nu recomandăm recoltarea tamponurilor orale în cazul păsărilor diagnosticate cu ingluvită și cu simptome de regurgitare, precum și cazul prezenței depozitelor pseudomembranare în cavitatea bucală, a stomatitei sau a leziunilor mucoasei.

3. În cazul *Psittacinelor*, recomandăm utilizarea tampoanelor orale cu tijă din plastic în locul celor din lemn.
4. În cazul utilizării penelor pentru sexarea moleculară recomandăm procesarea mecanică cu TissueLyserII a minim două penele proaspăt smulse, recoltate de la nivelul aripilor sau abdomenului, de mari dimensiuni, cu calamus intact, depozitate corespunzător, precum și evitarea utilizării penelor năpârlite.
5. Pentru facilitarea depozitării probelor de sânge, recomandăm hârtia de filtru și stocarea probelor sub forma de picături de sânge uscate (DBS), ca alternativă pentru tuburile de sânge cu anticoagulant și transportul acestora la temperatura camerei (20-22°C).

#### IV. ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

1. Teza de față cuprinde un studiu original și complex, care îmbină toate cele trei tehnici de sexare a păsărilor care nu prezintă dimorfism sexual (endoscopice, moleculare și necropsice) precum și studii comparative între acestea.
2. Identificarea moleculară a sexului la Scatiul de Venezuela (*Carduelis cucullata*) și Sticletele de Cultură (*Carduelis carduelis major*) a fost raportată pentru prima dată în literatura de specialitate.
3. Studiul actual raportează, pentru prima dată determinări de sex prin utilizarea de probe pereche de pene și tampon oral la speciile *Psittacula krameri*, *Neophema splendida* și *Agapornis spp.*
4. În teză este prezentată pentru prima oară în literatura de specialitate denaturarea mecanică a penelor cu ajutorul aparatului TissueLyserII și eficiența maximă a acesteia în ceea ce privește cantitatea ADN-ului obținut din pene.
5. Au fost identificate lungimi diferite de amplificare a produșilor PCR în ceea ce privește migrarea benzilor la femele, de exemplu femelele de Porumbel Domestic la care au migrat între aproximativ 300-350 bp, față de cele de la femelele de *Psittacine* (*Psittacula krameri* și *Psittacus erithacus*) care au migrat între aproximativ 350-400 bp.
6. O altă contribuție inovativă este aplicabilitatea practică imediată a cercetărilor din această teză pentru sexarea prin tehnici de genetică moleculară a păsărilor care nu prezintă dimorfism sexual, în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară, disciplina de Genetică și Eredopatologie Medical-Veterinară din cadrul FMV – USAMV Cluj-Napoca și asigurarea de servicii economice către proprietarii de păsări, crescători și Societatea Ornitologică Română.