

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ



Дајана С. Давитков

Карактеризација полно специфичних секвенци
ДНК у циљу форензичког испитивања врсте и
пола заштићених птица

Докторска дисертација

Београд, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



Dajana S. Davitkov

Characterization of sex - specific DNA sequences
for the species and sex determination of protected
birds for forensic examinations

PhD thesis

Belgrade, 2021.

Ментори:

Др Владимир Нешић, ванредни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Катедра за судску ветеринарску медицину и законске прописе

Др Зоран Станимировић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Катедра за биологију

Чланови комисије:

Др Јевросима Стевановић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Катедра за биологију

Др Урош Главинић, доцент

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Катедра за биологију

Др Јожеф Езвећ, научни сарадник

Зоолошки врт града Београда

Датум одбране докторске дисертације:

Захвалница

Докторска дисертација реализована је захваљујући ресурсима научноистраживачког пројекта ев. бр. ИИИ 46002, којим је руководио проф. др Зоран Станимировић, а под називом:

„Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране“

подржано од Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије у периоду од 2011. до 2019. године, а од 2020. године настављено институционално финансирање у оквиру научноистраживачког рада Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду по уговору ев. бр. 451-03-68/2020-14/200143

Велику захвалност дугујем доц. др Милошу Вучићевићу, на његовој помоћи, саветима и подршци током целог периода рада на овој докторској дисертацији!

Докторску дисертацију посвећујем својој породици!

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПОЛНО СПЕЦИФИЧНИХ СЕКВЕНЦИ ДНК У ЦИЉУ ФОРЕНЗИЧКОГ ИСПИТИВАЊА ВРСТЕ И ПОЛА ЗАШТИЋЕНИХ ПТИЦА

РЕЗИМЕ

Најзначајније претње које утичу на смањење бројности многих угрожених врста јесу криволов, илегалан лов, као и незаконита трговина и транспорт дивљих животиња. Када је у питању економски аспект, ове криминалне радње уједно представљају једну од најпрофитабилнијих илегалних трговина на свету. ДНК анализе из области форензичких испитивања дивљих животиња омогућавају идентификацију угрожених животињских и биљних врста које су предмет илегалне трговине. Због недвосмислене идентификације и могућности да се користе веома мали (па чак и деградирани) биолошки узорци, из различитих извора (нпр. ткива, кости, перје, љуске јаја, длаке, крљушти), молекуларно-генетичке технике постају све важније у откривању илегалног лова и промета дивљих животиња. Ова релативно нова дисциплина сада постаје кључно средство за борбу против илегалне трговине животињама и помоћ агенцијама за спровођење закона и управљање природним ресурсима. Циљ ове докторске дисертације је развијање молекуларно-генетичке методе за истовремено одређивање врсте и пола птица анализом *CND* гена, затим дизајнирање специфичних прајмера за одабране врсте, као и њихова провера и могућност коришћења.

Као материјал за ово истраживање коришћени су узорци перја пореклом од птица из Београдског зоолошког врта и узорака угинулих заштићених врста птица које су обдуковане на Катедри за судску ветеринарску медицину и законске прописе Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду (ФВМ УБ). Додатно, коришћени су и узорци из архиве Катедре за биологију ФВМ УБ. Коришћењем *Polymerase Chain Reaction* (PCR) технике и сета прајмера

обележених флуоресцентним бојама CHD1F/CHD1R и P1/P8 вршена је амплификација дела *Chromo Helicase DNA binding* (CHD1) гена и визуелизација продуката хоризонталном електрофорезом на агарозном гелу и методом капиларне електрофорезе. За добијање ампликона за секвенцирање, у циљу креирања нових прајмера за одређивање пола одређених врста, коришћен је необележени сет прајмера 2550F/2718R и P2/P8. Такође, извршено је и секвенцирање амплификата девет врста птица, у циљу добијања потпунијих информација о њима. Након секвенцирања и анализе добијених секвенци, креиран је нови пар прајмера за врсту *Sacatua alba*. Такође, добијене секвенце су депоноване у *online* генску базу (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Одређивање пола методом гел електрофорезе било је успешно код 60 јединки птица од укупно 71 испитиваног узорка. За птице из реда Strigiformes и птице из фамилије Fringilidae добијени резултати нису били поуздани, односно, производи амплификације добијени хоризонталном електрофорезом на агарозном гелу нису били јасни да би могли бити сигурни да ли су испитиване јединке мужјаци или женке. Такође, методом гел електрофорезе није било могуће утврдити прецизну величину CHD1 ампликона. За разлику од гел електрофорезе, капиларна електрофореза се показала успешном код свих испитиваних птица када је у питању детерминација пола, јер је омогућила добијање недвосмислених резултата код свих анализираних узорака. Када је у питању идентификација врсте коришћењем капиларне електрофорезе, ова метода се такође показала врло успешном. Код свих испитиваних јединки одређене су величине фрагмента CHD гена на W и Z хромозомима које служе при идентификацији врсте.

Добијени резултати указују да се капиларна електрофореза може користити као врло поуздана, брза и исплатива метода у циљу идентификације како врсте, тако и пола птица. Гел електрофореза је врло корисна за одређивање пола, али за све узорке код којих пол није могао бити детерминисан овом методом, капиларна електрофореза је била успешна. Секвенцирање обезбеђује утврђивање односа између врста и креирање нових и

позданијих прајмера. Применом наведених метода могуће је из остатака ткива утврдити врсту птице која је предмет форензичке анализе и потом на основу законске регулативе одредити степен њене заштите. На овај начин доприноси се истрази у спровођењу поступка против починиоца кривичног дела илегалног транспорта дивљих и угрожених птица. Добијени резултати су од великог значаја и за даљи развој ових метода у функцији ветеринарске форензике и за смањење стопе илегалне трговине животињама у Републици Србије, али и у целом свету.

Кључне речи: ветеринарска форензика, ДНК анализе, илегална трговина, пол и врста птица, CHD ген

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Ветеринарска форензика и државно ветеринарство

УДК број:636.6:57.088.7

Characterization of sex - specific DNA sequences for the species and sex determination of protected birds for forensic examinations

SUMMARY

The most serious threats that are leading to a reduction of many endangered species are poaching, illegal hunting, as well as illegal trade and transport of wildlife. When it comes to the economic aspect, these criminal acts are also one of the most economically viable trades in the whole world. Use of DNA analyzes in forensic examinations of wildlife enable the identification of different species of flora and fauna that are usually illegally traded. Due to the unambiguous identification and ability to use very small (and even degraded) biological samples from different sources (such as tissues, bones, feathers, egg shells, hair, scales), molecular genetics techniques are becoming increasingly important in detecting illegal hunting and wildlife trafficking. This relatively new discipline is now becoming a key point in the struggling against illegal trafficking and huge help for law enforcement and different organizations agencies which protect wildlife. The main goal of this doctoral dissertation is to provide more information on the variability of the CHD1 gene in bird species that are usually illegally transported, and also to assess the potential of capillary electrophoresis as a method of choice for sex and bird species.

As material for this research, samples of feathers originating from birds from the Belgrade Zoo and samples of dead birds that were postmortem examined at the Department of Forensic Veterinary Medicine and Veterinary regulations of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade (FVM UB) were used. Additionally, samples from the archives of the Department of Biology FVM UB were also used. Using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and a set of primers labeled with fluorescent dyes CHD1F / CHD1R and P1 / P8, part of the Chromo Helicase DNA binding (CHD1) gene was amplified by PCR, and product

were visualized by horizontal agarose gel electrophoresis and agarose gel electrophoresis. An unlabeled set of primers 2550F / 2718R and P1/P8 was used to obtain the amplicons for sequencing, in order to create new primers for determining the sex of certain species. Also, sequencing of samples of 10 bird species was performed, in order to obtain more complete information about them. After sequencing and analysis of the obtained sequences, a new primer pair was created for the species *Cacatua alba*.

Gender determination by gel electrophoresis was successful in 60 birds, from total of 71 examined birds. For birds of the order Strigiformes and birds of the family Fringilidae, the results obtained were not reliable, that is, the bands obtained by horizontal electrophoresis on an agarose gel were not clear enough to determine with certainty was it a male or a female bird. Also, it was almost impossible to appropriately determine the precise size of the CHD1 amplicon by gel electrophoresis. Unlike gel electrophoresis, capillary electrophoresis proved to be successful in all examined birds when it comes to sex determination, because it enabled unambiguous results to be obtained in all analyzed samples. When it comes to species identification using capillary electrophoresis, this method has also proven to be very successful. In all tested individuals, the sizes of the CHD gene fragment on W and Z chromosomes were determined, which can help in the species identification when it comes to birds.

The obtained results indicate that capillary electrophoresis can be used as very reliable, fast and cost-effective in order to identify both species and gender in birds. Gel electrophoresis is very useful for sex determination, but for all samples in which sex could not be determined by this method, capillary electrophoresis was successful. Sequencing provides the determination of the relationship between species and the creation of new and more efficient primers. By applying the mentioned methods, it is possible to define the species of bird which is the subject of forensic analysis from the remains of tissue and then determine the degree of its protection. In this way, it contributes to the investigation in the implementation of the procedure against perpetrator of criminal offense of illegal transport of wild and endangered birds. The results obtained in this study are of huge significance for the further development of

these methods in the function of veterinary forensics and for the reduction of the rate of illegal trade in animals in Republic of Serbia and in the whole world.

Keywords: CHD gene, DNA analysis, illegal transport, sex and species of birds, legislation, veterinary forensics

Major Field of Study: Veterinary medicine

Special Field of Study: Forensic veterinary medicine and veterinary regulations

UDK Number: 636.6:57.088.7

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. Филогенетско стабло птица	3
2.2. Трговина птицама кроз историју до данас	7
2.3. Врсте птица и разлози за њихову илегалну трговину	10
2.4. Међународни прописи за заштиту дивљих птица	16
2.4.1. Црвена листа врста	16
2.4.2. CITES	19
2.4.3. Бонска конвенција	20
2.5. Идентификација пола птица	22
2.6. Идентификација врсте птица коришћењем молекуларно-генетичких метода	25
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА	31
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	33
4.1. Материјал – прикупљање узорака	33
4.2. Методе	36
4.2.1. Екстракција ДНК из пера	36
4.2.2. PCR амплификација ДНК	37
4.2.3. Гел електрофореза и визуелизација PCR продуката	38
4.2.4. Капиларна електрофореза	38
4.2.5. Секвенцирање пурификованих секвенци	40
4.2.6. Креирање новог пара прајмера	40
4.2.7. Статистичка анализа добијених података	42
5. РЕЗУЛТАТИ	43
5.1. Резултати гел електрофорезе	43
5.2. Резултати капиларне електрофорезе	45
5.3. Резултати добијени секвенцирањем	54
5.4. Резултати дизајнирања сета прајмера	61

6. ДИСКУСИЈА	63
6.1. Одређивање врсте птица	63
6.2. Детерминација пола птица	68
6.3. Интерпретација резултата добијених секвенцирањем пурификованих ампликона	71
7. ЗАКЉУЧЦИ	76
8. ЛИТЕРАТУРА	78
9. ПРИЛОЗИ	93

СКРАЋЕНИЦЕ

BOLD - *Barcode of Life Data System*

CBRO - *Brazilian Ornithological Records Committee*

CHD - *Chromo Helicase DNA binding*

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

CMS - *The Convention on the Conservation on Migratory Species of Wild Animals*

DDBJ - *DNA Data Bank of Japan*

EMBL - *European Molecular Biology Laboratory*

FAO - *Food and Agriculture Organization*

InDels - *Insertion or Deletion*

ISAG - *International Society for Animal Genetics*

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SNP - *Single Nucleotide Polymorphisms*

STR - *Short Tandem Repeat*

UNEP-WCNC - *The UN Environment World Conservation Monitoring Centre*

WWF - *World Wide Fund for Nature*

ДНК - *Дезоксирибонуклеинска киселина*

ЕУ - *Европска унија*

1. УВОД

Једна од највећих претњи данашњице када је у питању очување и опстанак највећег броја дивљих врста јесте илегална трговина, лов и недозвољено транспортовање животиња. Главни објекти трговине заплењени унутар ЕУ су живе птице, затим биљке, тела птица и сисара, делови тела и њихови деривати. Иако су птице певачице, грабљивице, папагаји и сове заштићене путем CITES конвенције (cites.org), Бонском конвенцијом (<https://www.cms.int/>), као и националним законодавством (Правилник о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива, Сл. гласник РС, 5/2010, 47/2011, 98/2016), они су и даље предмет пријављених заплена у 79% свих случајева у ЕУ. Илегална трговина на овај начин доводи у ризик опстанак хиљаде врста и повећава ризик од зооноза којима су домаћини дивље животиње. Најчешћи разлог илегалне трговине дивљим птицама јесте њихова цена на тржишту и велика потражња због њиховог атрактивног изгледа.

Данас у великом броју земаља постоји свест о озбиљности овог проблема и у њима се на различите начине спроводи борба. Постоји велики број различитих националних и интернационалних правних аката који имају за циљ заштиту и очување дивље флоре и фауне. Међутим, механизми заштите угрожених врста се јако тешко спроводе. Претерано изловљавање, уништавање станишта, хватање и илегална трговина животињама довели су до повећања броја угрожених врста и негативног утицаја на биодиверзитет. Такође, проблем представља и кратак живот појединих врста птица, доношење на свет малог броја младунаца, дуже време потребно да се достигне полна зрелост, осетљивост на стрес и негативан утицај фактора средине и сл.

Због свих наведених разлога неопходно је радити на смањењу броја кријумчарених врста, јер једино на тај начин моћи ће се позитивно утицати на опстанак врста. Један од начина јесте санкционисање и спровођење кривично-

правних поступака по појединце и организације за које се установи да су се бавили овим криминалним радњама. Ово је једино могуће уколико се зна тачна врста јединке која је транспортована, јер се тада може одредити степен заштите заплењених јединки, а зависно од тога и правне последице.

Централна улога у савременим форензичким приступима у циљу идентификације врста резервисана је за ДНК анализу, као неизбежан корак у спровођењу закона и заштити угрожених врста птица. За одређивање пола и врсте користе се различите молекуларне технике, међутим, већина се односи на идентификацију врста сисара, док је до почетка овог истраживања постојало само једно истраживање које се односи на одређивање врста птица методом капиларне електрофорезе. Због недовољно информација о молекуларној техници која се може користити за истовремено одређивање пола и врста птица, али и одсуства студија које су испитивале варијабилност дужина полно-специфичног ампликона међу угроженим врстама птица, циљ овог испитивања је да се добије што више информација о варијабилности CHD1 гена за врсте које су често предмет илегалне трговине. Такође, циљ је да се процени капиларна електрофореза као метода избора за истовремено одређивање пола и врста птица, укључујући и потенцијал ове методологије као форензичког алата у санкционисању илегалне трговине дивљих животиња.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Филогенетско стабло птица

Филогенетско стабло птица је још у процесу израде. Научници и даље раде истраживања чији резултати допуњују слику о еволуцији птица. Постоји неколико филогенетских стабала која показују опште прихваћени поглед на птице и њихову еволуцију у односу на геолошку временску скалу (Слика 1).

Птице су најразноврснија класа (рецентних) копнених кичмењака. Са преко 10.000 рецентних врста показују изванредну разноликост у морфологији, екологији и понашању (Prum и сар., 2015). У последњој деценији, филогенетске анализе резултирале су предлогом бројних, нових односа међу птицама. Иако је геномска студија коју су спровели Prum и сар. (2015) пружила многе изузетно значајне информације, ограничено узорковање онемогућавало је даљи увид у еволуциону историју птица. Нова и изненађујућа схватања филогенетског стабла птица постигнута су поређењем секвенци различитих локуса нуклеарне ДНК у великом броју узорака од различитих таксона (Ericson и сар., 2006; Hackett и сар., 2008; Maug, 2011; McCormack и сар., 2013). Поред тога, везе између виших група је било јако тешко решити унутар Neoaves (монофилетска група формирана од свих изумрлих птица осим Palaeognathae и Galloanseres) (Prum и сар., 2015). Jarvis и сар. (2014) су решили неколико од ових кључних питања анализирајући читаве геноме 48 врста птица и резултати су чврсто подржали: (а) поделу Neoaves у Passerea и Columbea; (б) сестринску везу између Strisores и редове коју чине кукавице, тураци и бустарди (Otidimorphae); (ц) сестринску везу између Gruiformes и Charadriiformes; и (д) сестринску везу између Aequornithes (водене птице), Phaethontimorphae (тропске птице, кагу и сунчана чапља) и Telluraves (копнене птице).

Верује се да су се крокодили и птице у раном тријасу међусобно раздвојили, а фосили *Xilousuchus sapingensis* од пре око 25 милиона година иду у прилог овој хипотези (Nesbitt и сар., 2010). Следећи велики еволуциони догађај био је налаз *Archaeopteryx*, који датира још од 150 милиона година до периода

касне јуре (Dalsätt и сар., 2006). У периоду креде, од пре 65-70 милиона година птице су се брзо разилазиле у поткласе и редове које данас знамо. Прва разилажења потичу од Palaeognathae, групе птица које не лете и која обухвата кивије, емуе, нојеве и мове (Wang и сар., 2021). Следеће су се одвојиле Galliformes. Затим су се Columbiformes разгранале, формирајући групу која се састоји од врста попут голубова и кукавица. Након тога су се Gruiformes разишли, укључујући птице као што су ждралови и барске коке. Следећа је била Aequorlitorinithes, класа птица која укључује арктичке морске папагаје, фламингосе и друге обалне птице. Коначно, ту су Inopinaves, који укључују папагаје, соколове, хоацине и детлиће. Из ових веома генералних категоризација, птице су еволуирале и преобразиле се у много јасније врсте (Prum и сар., 2015).

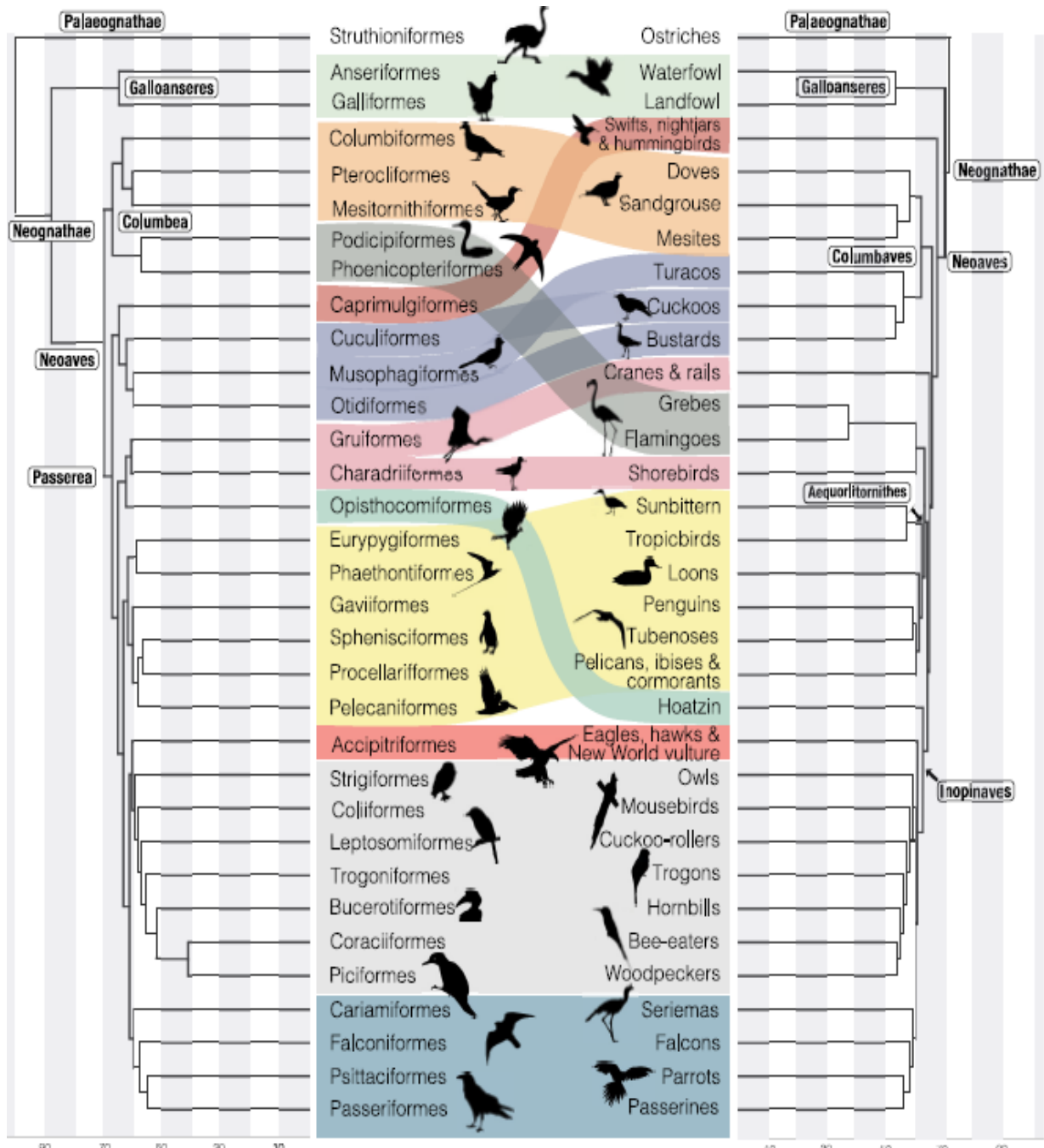
Рани преци хиљада врста птица какве данас познајемо изгледа да су се нагло развили за неколико милиона година након изумирања реполиких диносауруса. Истраживања такође откривају односе међу рецентним птицама унутар групе. На пример, осим патака и ждралова, већина водених птица је блиско повезана - што сугерише да су оне живеле широм планете у воденим нишама након изумирања диносауруса и нису, као што се раније мислило, еволуирали из више независних линија (Prum и сар., 2015). Резултати такође показују да је *Opisthocomus* најстарија птичја лоза (стара 64 милиона година), која се састоји само од једне постојеће врсте - хоацина (*Opisthocomus hoazin*), али се његово место у стаблу још са сигурношћу не зна, иако се знају његове сестринске везе са другим птицама (Hackett и сар., 2008).

Jarvis и сар., 2014.

48 врста

Prum и сар., 2015.

198 врста



Милиони година

Милиони година

Слика 1. Преглед главних конкурентских хипотеза на основу две студије са различитим прикупљеним података: (а) Анализа фокусирана на секвенце Jarvis и сар. на основу целог генома постоје подаци о секвенци за 48 птица анализирајући 8251 локус који кодира протеине, 2516 интрона и 3679

ультраконзервираних елементи; (б) Анализа фокусирана на узорковање таксона од стране Prum и сар. са 198 врста али само 0,4 Мб сачуваних података о секвенци кодирања. Ове две хипотезе је тешко ускладити због разлика у обиму геномског и таксономског узорковања, типу локуса и метода анализирања.

Класа Aves се данас дели на поткласу Archaeornithes и Neornithes (Hackett и сар., 2008). Према подацима до којих су дошли Sibley и сар. (1988) сматра се да су се птице поделиле на Archaeornithes и Neornithes пре 79 милиона година. Поткласа Archaeornithes обухвата изумрле врсте, док поткласа Neornithes подразумева рецентне врсте и она обухвата два надреда Palaeognathae и Neognathae. Надред Palaeognathae су крупне птице које су током еволуције изгубиле способност летења и њени представници су киви, ној, казуар и нанду. Надред Neognathae обухвата птице које имају способност летења и ту спада велика већина рецентних врста (односно све сем неколико рецентних врста надреда Palaeognathae), а неки од најбројнијих врста су из редова Ciconiformes, Falconiformes, Strigiformes, Galliformes, Columbiformes, Psittaciformes, Coraciiformes, Passeriformes и Anseriformes.

Нови увид у дистрибуцију развојних модова у птичјем филогенетском стаблу открива да слични облици развоја имају историјски погрешне морфолошке филогеније, што доводи, нпр. до спајања колибрија, голубова и кукавица са „правим копненим птицама“ и пеликанима (Wetmore, 1934; Livezey и Zusi, 2007). Ове претходне полифилетичке класификације су делимично резултирале еволуцијом значајних конвергенција у алтрицијалне птице, као што су већи мозгови, вокално учење, арбореални стил живота, специјализације за стопала, и минијатуризација (Kirkwood и сар., 1989; Starck, 1993; Botelho и сар., 2014).

Финализација филогенетског стабла птица уз помоћ молекуларно-генетичких анализа омогућиће орнитолозима да дефинитивно истраже многа отворена питања у еволуционој историји птица.

2.2. Трговина птицама кроз историју до данас

Познато је да су људи још пре 4.000 година хватали, чували и гајили птице као љубимце (Collar и сар., 2007; Carrete и Tella, 2008; Tidemann и Gosler, 2010) и да је историја трговине птицама стара више од 1.000 година. Домородачки народ је чувао и користио птице у Јужној Америци и када је Колумбо први пут стигао у Нови свет, он и његова посада су видели да домороци осим ручно предене вуне и дрвеног копља са врхом од медузиног пипка, продају и живе папагаје. Продаја папагаја је већ од тог тренутка утицала на продају и трговину живим птицама широм света (Thomsen и Brautigam, 1991).

Анализе историјских докумената указују и да су Индијанци узгајали птице због њихове лепоте, песме и друштва. Европљани који су се враћали са експедиција током 16. века доносили су непознате живе животиње како би доказали откриће нових континената (Sick, 1997). Једне од првих врста које су донешене у Европу потичу са територије Бразила и датирају од пре још 1.500 година.

Током 70-их година XX века забрана извоза дивљих животиња се проширила целим светом и до средине 80-их година скоро све земље су формирале националне законе који су се односили на илегалну трговину дивљим врстама флоре и фауне, а били су у оквиру CITES конвенције, која је ступила на снагу 1975. године (TRAFFIC, 2018).

Експлоатација дивљих птица у комерцијалне сврхе почела је током средине XIX века. Изловљавање великог броја животињских врста из природе које су се користиле као модни детаљи, углавном у Европи, ескалирало је крајем XIX и почетком XX века. Два светска рата су смањила извоз врста у Европу, али су га преусмерила у Северну Америку. Трговало се деловима тела птица и живим птицама. Три деценије илегалног извоза птица из Јужне Америке између 1950. и 1980. године довеле су до извоза милиона птица из овог региона (TRAFFIC, 2018).

Чланови реда Psittaciformes обично се лове због својих гласовних способности, лепоте перја и стављања у промет као кућних љубимаца (Weston и Memon, 2009). Међутим, чланови других редова птица такође су у опасности од илегалне трговине. Последица ове радње је да су данас готово све врсте папагаја из реда Psittaciformes наведене у CITES Прилогу I. Најчешће илегално транспортоване врсте папагаја су *Amazona aestiva*, *A. ochrocephala*, *Pionites melanocephala*, *Ara chloroptera* и *A. ararauna*.

Сматра се да су оквири ове трговине огромни – стотине хиљада птица се илегално улови сваке године. Вредност ових птица достиже два до три милиона евра годишње, док се вредност целокупне индустрије процењује на 23 милиона долара годишње (Channing, 2017; TRAFFIC, 2020).

Током 2018. године у ЕУ било је укупно 496 случајева илегалне трговине и конфисковања птица (1.135 примерака). Пријављена вредност илегалне трговине живим животињама или њиховим деловима у 2018. години износила је 2.8 милиона еура, док је та вредност у 2017. години била 1.7 милиона. У 2018. години државе чланице ЕУ пријавиле су 6.012 записа о заплени животиња. Француска, Немачка, Велика Британија, Шпанија и Холандија пријавиле су 79% свих случајева заплене за 2018. годину (TRAFFIC, 2020).

Од укупне вредности свих заплењених животиња, птице се налазе на другом месту одмах иза живих јегуља. Укупна вредност илегално транспортованих птица у 81 заплени износила је 127.312 еура.

Европска унија се данас сматра највећим тржиштем дивљих животиња и има највећу улогу у легалној и илегалној трговини (Engler и сар., 2007; Sina и сар., 2016). У фебруару 2016. године Европска комисија је усвојила "ЕУ акциони план против кријумчарења дивљом флором и фауном 2016-2020", у циљу поштравања мера и превенирања илегалног транспорта.

Данас су аеродроми главна локација за пленидбе и на њима се обави приближно 37% од укупног броја заплена (2.218 записа о заплени), следе поштански центри (1.149 записа о заплени), приватне куће (770 заплена) и

продавнице (491 заплена). Преостале заплене су обављене на другим локацијама, укључујући морске луке, путеве и аутопутеве, сајмове/изложбе и зоолошке вртове (TRAFFIC, 2020). Данас у Европи постоји значајна потражња за кућним љубимцима, укључујући гмизавце и птице. Одређене европске земље са великим, међународним аеродромима, попут Француске и Холандије, често служе као транзитна места за трговину животињама између Америке, Африке и Азије.

Неколико европских земаља имало је високу стопу заплене дивљих животиња без обзира да ли одатле потичу, у транзиту су или им је та земља крајња тачка, што сугерише да уколико постоје добри механизми претреса на царини могуће је и зауставити ове криминалне радње.

Од 349 живих птица које су у 2018. години одузете унутар ЕУ, укупно 316 били су папагаји, попут Фишерове љубавне птице (*Agapornis fischeri*), црноглаве љубавне птице (*A. personatus*) (Прилог 1/ Додатак Б) и жакоа (*Psittacus erithacus*) (Прилог 1 / Додатак А), које су углавном пријавиле Шпанија и Португал. Примера ради, Шпанија је пријавила заплене укупно 143 живе птице, укључујући 60 Фишерових љубавних птица, углавном из приватних кућа (TRAFFIC, 2020).

Током 2018. године државе чланице ЕУ пријавиле су 62 интерне евиденције о заплени које су укључивале укупно 161 примерак тела, делова и деривата птица, од којих су већина била тела и трофеји (углавном *Falconiformes* spp.). Мађарска и Аустрија биле су главне земље које су пријављивале ове илегалне радње. На пример, Мађарска је пријавила једну евиденцију о заплени која је обухватила укупно 43 тела, укључујући 13 тела евроазијског врапца, који су одузети из приватних кућа (TRAFFIC, 2020).

Случајеви трговине птицама, посебно случајеви који потичу из Америке, истакнути су на мапама рута за 2016. и 2017. годину али је њихов број смањен у 2018. години. Овај очигледан пад у трговини птицама могао би одражавати стварну промену у учесталости тих незаконитих активности или би могао да

буде споредни ефекат промене у јавном извештавању о заплени, приоритетима примене закона или методама трговине. Пад се, међутим, поклопио са случајем хапшења 29 особа (из децембра 2017. године), повезаних са шпанском мрежом трговине људима, сугеришући да промена на картама рута приказује стварни пад активности трговине птицама (TRAFFIC, 2019).

У последње три деценије уочен је и повећан раст интернет продаје, која је у великој мери утицала и на илегалну и легалну трговину животињама (Haysom, 2019). Криминалне радње које се спроводе путем интернета, а укључују дивље животиње, привукле су пажњу међународних и невладиних организација. Резултати укључују многе студије *online* тржишта дивљих животиња, које пружају битне квалитативне и квантитативне информације на овом тржишту, које је у развићу (Morgan и Chang, 2017; Harris и Shiraishi, 2018). Истраживањем које је спроведено од стране WWF (TRAFFIC, 2020) пронађено је чак 106 активних налога који се баве интернет трговином заштићених животиња. Од укупног броја животиња највише су биле заступљене птице и то на 49 налога и гмизавци на 43 налога. Најчешће су продаване следеће врсте птица: *Ara glaucogularis*, *Anodorhynchus hyacinthinus*, *Amazona agilis*, *A. collaria* и *Probosciger aterrimus*.

2.3. Врсте птица и разлози за њихову илегалну трговину

Готово све врсте папагаја на свету заштићене су CITES конвенцијом од којих се преко 40 врста налазе у CITES Додатку I, највишем нивоу заштите. Сви остали папагаји (осим три врсте) наведени су у Додатку II, који регулише трговину кроз систем издавања дозвола (UNEP-WCMC, 2015). Незаконита трговина папагајима укључује и кријумчарење јаја и живих животиња из дивљине и фалсификовање докумената.

Дивље птице уопште, а нарочито неотропски папагаји (породица Psittacidae) веома су цењени, посебно од стране колекционара, због свог

шареног перја, способности мимикрије, егзотичне привлачности и реткости (Jan и Fumagalli, 2016).

Породица Psittacidae садржи више од 370 врста папагаја распрострањених широм света, укључујући аре (макаое), амазонце, какадуе (Collar, 1997). Губитак станишта у комбинацији са илегалном трговином представља значајну претњу овим врстама. Према IUCN Црвеној листи угрожених врста, сматра се да 101 врсти папагаја прети изумирање (Међународна унија за очување природе и природних ресурса, 2015).

Бразил има највећи диверзитет када је у питању орнитофауна, са тренутно познатих 1.832 врсте (CBRO, 2011), што представља око 57% свих врста птица Јужне Америке (Marini и Garcia, 2005). Нажалост, Бразил има највећи број угрожених врста птица (Collar и сар., 1997), од којих је 189 дефинисано као угрожено на Црвеној листи (IUCN, 2011) и 160 које су угрожене на националном нивоу (Silveira и Straube, 2008). Управо због великог броја врста, илегална трговина птицама је у великој мери заступљена на територији Јужне Америке, одакле се птице илегално транспортују у Северну Америку и Европу. Врсте као што су Глауков макао (*Anodorhynchus glaucus*) и мали плави макао (*Cyanopsitta spixii*) истребљене су управо због њиховог неконтролисаног хватања и продаје (Marini и Garcia, 2005).

Истраживања су показала да се у Бразилу тргује са преко 295 врста птица које спадају у 177 родова и 56 фамилија. Фамилије птица са којим се најчешће тргује су Emberizidae (16,3% свих забележених врста), Psittacidae (15%), Thraupidae (8,6%) и Icteridae (6,7%). Најчешће су то шафран зеба (*Sicalis flaveola*), риботрби дрозд (*Turdus rufiventris*), белогрли сејдер (*Sporophila albogularis*), жутотрбушаста сејдер (*Sporophila nigricollis*), *Coryphospingus pileatus*, *Sporophila lineola* и *Paroaria dominicana*. Једна од познатих врста која је често предмет илегалне трговине и гаји се и у Србији је плавочели амазонац *Amazona aestiva* (Marini и Garcia, 2005).

Избор врста којим ће се трговати зависи од лепоте њиховог перја, али и од њиховог гласа. Други битан фактор је то колико је нека врста ретка. Такође, битан фактор је и пол (сматра се да мужјаци лепше певају па су зато скупљи) и да ли су припитомљене или не (Marini и Garcia, 2005).

Сматра се да чак 80% транспортованих врста угине што додатно утиче на неетичност ове илегалне радње (Toufexis, 1993). Разлози велике смртности ухваћених птица су различити: 1) одређен број птица успе да побегне, међутим при бегу се повреде и угину; 2) животиње са ранама или без перја се убијају јер се сматра да су "испод стандарда"; 3) женке Passerine, као што су *Tangara spp.* се убијају због мале вредности; 4) услед угушења и стреса.

Врсте као што су *Aratinga solstitialis*, којих је некада било у великом броју, сада су због илегалног лова и продаје под великим притиском и могућношћу угрожавања. Такође и *Gubernatrix cristata* је услед константног експлоатисања у опасности.

Птице из фамилије Psittacidae су се од самог потписивања CITES конвенције 1975. године сматрале кључним за заштиту. Од укупно 183 државе које су CITES потписнице, 103 су до сада пријавиле извоз папагаја од 2000. године до данас. Најчешће врсте којима се тргује су наведене у Табели 1.

Табела 1. Приказ држава које су извезиле папагаје током 2000-2013. године и број извезених врста и јединки (TRAFFIC report, 2018, <https://www.traffic.org/site/assets/files/11517/birds-eye-view.pdf>)

Држава	Број извезених птица	Број извезених врста	Најчешће врсте којим се тргује; број јединки у природи те државе
Јужна Африка	144.088	64	<i>Amazona aestiva</i> ; 21.708
Гвајана	139.485	21	<i>Ara chloroptera</i> ; 13.837
Аргентина	65.878	34	<i>Amazona aestiva</i> ; 26.754
Холандија	63.056	57	<i>Forpus coelesits</i> ; 21.824
Суринам	74.890	18	<i>Pionites melanocephala</i> ; 8.866
Перу	36.620	14	<i>Aratinga wagleri</i> ; 14.872
Сингапур	29.803	42	<i>Forpus coelesits</i> ; 3.770
Белгија	19.475	53	<i>Bolborhynchus lineola</i> ; 8.637
Парагвај	10.988	5	<i>Nandays nendays</i> ; 4.753
Филипини	9.980	42	<i>Ara ararauna</i> ; 1.571
Малезија	9.505	33	<i>Bolborhynchus lineola</i> ; 2.468
Тајван	8.997	27	<i>Bolborhynchus lineola</i> ; 4.301
САД	8.637	46	<i>Amazona ochrocephala</i> ; 1.331
Никарагва	2.866	2	<i>Amazona farinosa</i> ; 1.807
УАЕ	2.658	21	<i>Amazona aestiva</i> ; 630

Осим папагаја, лов и илегална трговина птица певачица ради коришћења у исхрани у великој мери угрожава конзервацију тих врста у Европи. Ово су високо организоване криминалне радње у југоисточној и централној Европи које обухватају илегалан лов и недозвољену трговину овим птицама у северну Италију и Малту, где оне представљају деликатес. Велики број врста је заштићен ЕУ законодавством, као и националним законима, док су неке од врста врло ретке (TRAFFIC, 2008).

Илегалан лов и трговина дивљим птицама у југоисточној Европи последњих година се у највећој мери дешава на територији Мађарске, Бугарске, Румуније, Србије и Црне Горе, с тим да се ове радње врше и на територији Босне и Херцеговине, Северне Македоније, Албаније и Хрватске. Главне земље транзита су Словенија, Хрватска и Мађарска, одакле се птице извозе у Италију (TRAFFIC, 2008). Ловци малих птица углавном користе илегалне методе током лова да би уловили максималан број птица. Од илегалних метода најчешће се користе танке мреже, које се још називају „мреже за измаглицу“, аутоматске или полуаутоматске пушке, као и лепљиве траке. Убијене птице се углавном сакривају у аутомобилима, хладњачама или личном пртљагу (Россо и Isotti, 2006).

Када говоримо о птицама певачицама, оне се често илегално лове да би се слале у Италију као деликатес (често из рода *Carduelis* и *Fringilla* које су заштићене међународним, европским и националним прописима). Једна од најређих врста која се лови је гуска црвеноврата (*Branta ruficollis*), класификована као угрожена на црвеној листи. Европска популација прдаваца (*Crex crex*) некада је бројала преко 1.300.000 парова, али је до 1970. године дошло до драматичног пада броја ових птица услед уништавања њихових станишта. Слична ситуација је и са популацијом обичних препелица (*Coturnix coturnix*) у централној и источној Европи. Само током два месеца 2004. године у Србији је изловљено преко 38.000 препелица, од тога 90% њих је убијено на илегалан начин коришћењем мрежа или полуаутоматских пушака (Simić и сар., 2003; Simić и Тосаков, 2005). Уколико се овом проблему не посвети више пажње иста судбина може задесити и друге врсте птица Европе, као што је случај са грлицом (*Streptopelia turtur*) (Россо и Isotti, 2006). Ова врста је класификована као врста чији се број јединки убрзано смањује, а ипак је и даље једна од најчешће илегално уловљених птица (TRAFFIC, 2008).

У периоду од 2000. до 2006. године на територији Словеније, Хрватске, Србије и Мађарске заплењено је преко 100.000 јединки дивљих птица. Једна од највећих заплена била је на територији Србије и бројала преко 60.000 јединки.

Сматра се да је у периоду од шест година у Италију илегално увезено преко два милиона птица уловљених у Србији. Укупно су биле 83 различите врсте птица при чему највише пољских шева, обичних препелица и грлица. Од укупног броја свих врста, 68 врста је било забрањено ловити, а 33 су биле веома ретке врсте (TRAFFIC, 2008).

Од приближно 1.300 врста птица у Индији, са преко 450 врста се илегално тргује (Inskipp и Thomas 1976; Inskipp, 1983; Ahmed, 2004). Главна мета трговине су сове. Све врсте сова која настањују Индију заштићене су Актом о заштити дивљих животиња из 1972. године (TRAFFIC, 2010). У табели 2 приказане су најчешће врсте сова из Индије којима се тргује.

Табела 2. Учесталост трговине различитим врстама сова из Индије (TRAFFIC India, 2008)

Латински назив	Број јединки продат на црном тржишту од 1992-2008 године
<i>Athene brama</i>	562-647
<i>Tyto alba</i>	101-106
<i>Bubo bengalesis</i>	73
<i>Glaucidium radiatum</i>	59
<i>Otus bakkamoena</i>	54
<i>Ketupa zylonensis</i>	27
<i>Bubo coromandus</i>	16
<i>Strix ocellata</i>	12
<i>Glaucidium cuculoides</i>	12
<i>Glaucidium brodiei</i>	9
<i>Strix leptogrammica</i>	4
<i>Otus sunia</i>	3
<i>Tyto longimembris</i>	1

Inskipp (1983) је документовао осам врста сова извезених из Индије између 1970. и 1982. године у Уједињено Краљевство, Швајцарску и САД. Он је забележио да се из Индије и Тајланда извезло 590 сова, са морталитетом од 13% (Inskipp, 1975). Између 1996. и 2001. уочено је да се велики број врста сова у Индији илегално хвата и излаже у зоолошким вртovima широм света.

Постоји велики број разлога за хватање и трговину совама: 1) излагање у зоолошким вртovima; 2) препарисање животиња које служе као трофеји; 3) за исхрану; 4) у азијским земљама у медицинске сврхе; 5) као помоћ за хватање других птица (Ahmed, 2010).

2.4. Међународни прописи за заштиту дивљих птица

У циљу очувања дивљих животиња, велики број светских организација труди се да унапреди живот и опстанак угрожених врста. Услед наглог пада популације сисара, гмизаваца и птица оформиле су се организације које имају за циљ лакшу комуникацију и спровођење законске регулативе између различитих земаља. Циљ је да све земље буду потписнице споразума о очувању врста, јер ће се на тај начин лакше контролисати и транспорт и илегална трговина.

2.4.1. Црвена листа врста

Међународна унија за очување природе (*International Union for Conservation of Nature - IUCN*) 1964. године је успоставила „Црвену листу“ угрожених врста. Данас, унија представља најсвеобухватнији извор информација о глобалном статусу очувања животиња, гљива и биљака. Црвена листа је кључни показатељ здравља глобалног биодиверзитета. Она представља далеко више од самог пописа, јер заправо обухвата спровођење активности за очување биодиверзитета и промену политике односа према појединачним врстама које

су од кључног значаја за заштиту природних ресурса који су нам потребни за преживљавање. Она пружа информације о величини популације, станишту и екологији врста, њиховој употреби и трговини, али и претњама и активностима које ће помоћи у очувању природе.

Црвену листу користе владине агенције, друштва за заштиту дивљих животиња, невладине организације које се баве заштитом природе, планери природних ресурса, образовне организације, студенти и пословна заједница. До данас су многе животињске врсте, укључујући сисаре, водоземце, гмизавце, птице, корале и четинарске шуме свеобухватно процењене. Поред оцене ново-признатих врста, IUCN Црвена листа такође поновно процењује статус неких постојећих врста.

Тренутно на Црвеној листи IUCN постоји више од 96.500 врста, а више од 26.500 је под претњом изумирања, укључујући 40% врста водоземаца, 34% врста четинара, 33% врста корала за изградњу гребена, 25% врста сисара и 14% врста птица. Црвена листа IUCN је кључна не само за помоћ у идентификацији оних врста којима је потребан опоравак, већ и за фокусирање програма очувања на идентификацију кључних локација и станишта које је потребно заштитити. Такође, Црвена листа IUCN помаже да се направе будући приоритети очувања и финансирања.

Унија је утврдила критеријуме угрожености врста, на основу којих се процењене врсте сврставају у неке од категорија:

- o Extinct (EX) – ишчезла;
- o Extinct in the wild (EW) – ишчезла у дивљини;
- o Critically Endangered (CR) – крајње угрожена;
- o Endangered (EN) – угрожена;
- o Vulnerable (VU) – рањива;
- o Near Threatened (NT) – потенцијално угрожена;

- o Least Concern (LC) – мала забринутост

Поред њих, утврђене су и категорије:

- o Data deficient (DD) – таксон са недовољно података о угрожености;

- Not evaluated (NE) – таксон није процењен, или није процењен по IUCN критеријумима.

-

У табели 3 дати су подаци о броју процењених врста, односно врста којима је одређена категорија угрожености на основу категоризације коју даје IUCN.

Табела 3. Број процењених врста према Међународној унији за заштиту природе

Црвена листа	Број процењених врста
EX (таксон који је изумро)	799
EW (таксон који је нестао у природи)	61
CR (крајње угрожени таксон)	4.224
EN (угрожени таксон)	6.243
VU (рањив таксон)	10.463
NT (таксон који је на граници да буде угрожен)	4.742
LC (таксон у нижем степену опасности)	31.845

2.4.2. CITES

CITES представља међународни договор између држава потписница ове конвенције. Основни циљ је да се регулише трговина дивљим животињама и биљкама на начин на који се не угрожава њихов опстанак (cites.org/eng).

Пошто се трговина дивљим примерцима флоре и фауне не дешава само унутар једне државе, већ у целом свету, потребно је да се све земље удруже и заједно сарађују да би се све врсте, а посебно угрожене, сачувале од изумирања. Основни концепт CITES је управо такав начин заједничке сарадње. Конвенција покрива различите степене заштите за више од 35.000 врста животиња и биљака, без обзира да ли се тргује живим примерцима, крзеним капутима или сушеним биљем.

CITES је израђен као резолуција усвојена 1963. године на састанку чланова IUCN. Чланови који су наведени у тексту Конвенције су договорени на састанку у Вашингтону у Сједињеним Америчким Државама, 3. марта 1973. године, а 1. јула 1975. године CITES је ступио на снагу. Оригинал Конвенције је депонован на пет светских језика приликом чега се водило рачуна да сваки текст буде оригиналан независно од језика којим је писан (<https://cites.org/eng/disc/what.php>).

CITES је међународни споразум којег се државе и регионалне организације за економску интеграцију добровољно придржавају. Државе које су пристале да буду везане Конвенцијом („придружене“ CITES) познате су као Странке. Иако је CITES правно обавезујући за Странке - другим речима, они морају да спроводе Конвенцију - она не замењује националне законе. Дуги низ година CITES је био један од споразума о очувању са највећим чланством, са тренутно 183 државе потписнице. Врсте обухваћене CITES-ом наведене су у три Прилога, према степену заштите који им је потребан.

Додатак I садржи у себи све врсте биљака и животиња којима прети ишчезавање. Транспорт ових врста није дозвољен, осим у посебним ситуацијама и уз све потребне дозволе. У овом додатку налази се укупно 669 врста и 38 подврста животиња. Од тога је укупно 318 врста и 20 подврста сисара, 155 врста и 8 подврста птица, 87 врста и 5 подврста гмизаваца, 24 врста водоземаца, 16 врста риба и 69 врста и 5 подврста бескичмењака.

Додатак II обухвата врсте које нису нужно угрожене изумирањем, али чија се трговина мора контролисати како би се избегло коришћење које није у складу с њиховим опстанком. У овом додатку налази се укупно 4.925 врста и 12 подврста. Од овог броја укупно је заштићено 513 врста и 7 подврста сисара, 1.278 врста и 4 подврсте птица, 749 врста гмизаваца, 134 врсте водоземаца, 107 врста риба и 2.171 врста и 1 подврста бескичмењака.

Додатак III садржи врсте које су заштићене у најмање једној земљи, која је затражила помоћ од других CITES страна у контроли трговине. Промене у Додатку III следе посебан поступак од измена додатака I и II, будући да свака страна има право на једностране измене и допуне. У овом додатку налази се укупно 190 врста и 14 подврста животиња. Од овог броја укупно је заштићено 52 врсте и 11 подврста сисара, 27 врста птица, 61 врста гмизаваца, 4 врсте водоземаца, 24 врсте риба и 22 врсте и 3 подврсте бескичмењака.

Узорак врста наведених у CITES-у може се увести или извести (или поновно извести) из државе потписнице Конвенције само ако је прибављен одговарајући документ и предочен за одобрење на месту уласка или изласка.

2.4.3. Бонска конвенција

Осим наведених конвенција које се односе на заштиту дивљих врста, важно је напоменути да постоји и конвенција која се бави искључиво миграторним врстама, позната под називом Бонска конвенција и представља један од темељних прописа из подручја заштите природе, настао с циљем

очувања миграторних врста дивљих животиња у читавом подручју њиховог распрострањења. Бонска конвенција сматра да су миграторне врсте важан и непроцењив фактор у одржавању природног баланса на планети и да кроз заштиту ових врста се штити и природа и сам човек. Конвенција наводи да државе морају поклонити пажњу и указати заштиту не само врстама које живе у њиховој земљи, већ и свим оним животињама које се нађу у њој приликом својих миграција. Такође, циљ конвенције је и да утиче на свест људи колико су све животиње важне и то не само са аспекта екологије и заштите животне средине, већ и са аспекта економије, генетике и науке. Све земље потписнице Конвенције договориле су да ће се статус очувања сматрати повољним у следећим ситуацијама:

а) уколико је животињска врста у миграцији способна за живот у датим околностима;

б) када је величина ареала у којем животиња обитава таква да нема опасности да ће се изгубити током дужег времена;

в) када постоји станиште у којем животиња може да борави и нема опасности да ће се изгубити током дужег времена;

г) када број јединки које мигрирају се не смањује, већ супротно, повећава се.

Конвенција има два додатка. Угрожене миграторне врсте којима прети изумирање уврштене су у Додатак I Конвенције. Државе потписнице Конвенције обавезале су се да за њих осигурају мере строге заштите, очување и/или рестаурацију станишта, те ублажавање препрека на миграцијским путевима. Конвенција такође подстиче директну међудржавну сарадњу код очувања појединих врста, склапањем засебних међународних уговора.

У прилогу I налазе се све оне врсте које су на основу проверених литературних података и сазнања угрожене врсте животиња. За разлику од врста наведених у прилогу I ове конвенције, у прилогу II су наведене оне животиње чија је популација у паду, али које нису још угрожене. За врсте наведене у прилогу II потребно је посебно обратити пажњу и то кроз потписивање договора између држава у којима се налазе или кроз које пролазе

те миграторне врсте. Република Србија је 6. новембра 2007. године прихватила Бонску конвенцију потписивањем указа од стране Народне скупштине и на тај начин постала чланица Бонске конвенције.

2.5. Идентификација пола птица

Одређивање пола птица представља врло захтеван задатак, узимајући у обзир да је више од половине врста птица мономорфно, а и да птићи птица које нису мономорфне углавном не поседују екстеријерне карактеристике које би могле бити корисне за одређивање пола. Најједноставнија и уједно најјефтинија метода за детерминацију пола је поређење различитих морфолошких карактеристика (Eason и сар., 2001). Међутим, резултати добијени проценом морфолошких карактеристика врло често буду нејасни (Archawanon, 2002) и настају као последица разлике морфолошких параметара током различитих годишњих доба или фазе репродуктивног циклуса (Marks и Leasure, 1992).

Осим коришћења морфолошких параметара, код појединих врста птица (нпр. патака, птица певачица) пол је могуће детерминисати и на основу звука које производе, као и од њихове „песме“ (Batellier и сар., 2004; Volodin и сар., 2009). Међутим, иако ова метода ни на који начин не утиче на здравље и добробит животиња, не може се сматрати поузданом, јер песма и звукови зависе од здравственог статуса јединке, структуре кљуна, као и величине целог тела животиње (Podos, 2001). Све ове карактеристике су променљиве, па самим тим на њих се не може ослонити.

Један од начина детерминације пола описан је још 1978. године од стране Bergovitz и сар. и заснива се на одређивању концентрација фекалних стероида. Ова метода се базира на томе да женске јединке имају већи однос естрогена и тестостерона у фецесу у односу на ту вредност код мушких јединки. Као и за претходну методу, и за овај начин детерминације пола важи да није инвазиван,

али исто тако није ни поуздан, јер и он зависи од периода године и од концентрација хормона у тренутку узорковања.

Осим наведених метода, за детерминацију пола птица могу се користити и цитогенетичке анализе (Solari, 1994). За разлику од сисара код којих су мужјаци хетерогаметни, код птица су хетерогаметне женке (присуство ZW хромозома). Као узорак се користи крв или ћелије пера. Када је у питању узимање крви, оно се сматра за инвазивну методу и углавном га треба избегавати (Archawaronon, 2004).

Nakamura и сар. (1990) развили су метод одређивања пола птица применом проточне цитометрије, који за основни циљ има одређивање количине ДНК која се налази у ћелији. Иако разлика у количини изгледа незнатна, постоји могућност њене детекције (Tiersch и сар., 1991). Међутим, на ову методу у великој мери утичу разлике које могу бити присутне на полним хромозомима, као и присуство понављајућих секвенци, те методу не можемо сматрати поузданом, односно довољно прецизном.

Од свих коришћених метода, методе које су засноване на анализи делова ДНК полних хромозома показале су највеће могућности за развој сигурне, брзе и економски прихватљиве анализе за одређивање пола код птица. Откривање и употреба PCR методе која је почела још средином 80-их година двадесетог века представљала је само почетак анализирања ДНК молекула (Alberts и сар., 2002). У односу на све до сада коришћене методе, PCR методе имају велики број позитивних страна, а као једна од најважнијих истиче се и могућност коришћења малих узорака до којих није тешко доћи (перо, фецес, брис). Такође, позитивна страна је и чињеница да у већем броју случајева за узимање узорака није потребно животињу хватати, манипулисати њом и фиксирати је, а на тај начин и проузроковати додатни стрес. Одређивање пола PCR методама могуће је чак и код ембриона.

Да би целокупан процес добијања резултата био успешан мора да се задовољи први корак процеса, који се односи на изолацију ДНК. Као узорак за

ДНК анализе најбоље је узорковати каламус пера, али се могу користити и друга доступна ткива, као што су крв, узорак фецеса, брис уста или део коже (Idaghdour и сар., 2003; Jensen и сар., 2003; Harvey и сар., 2006; Handel и сар., 2006; Bantock и сар., 2008). ДНК анализа се заснива на умножавању полно специфичних фрагмената на Z и W хромозомима коришћењем посебних прајмера, направљених на тај начин да покажу интронске разлике (дужине и распореда нуклеотида у секвенци) у оквиру полно везаних гена, након визуелизације PCR продуката, на пример, путем електрофорезе. PCR метода је једноставна за извођење, високо осетљива и није скупа, па из тог разлога је и најшире примењивана од свих до сада познатих метода (Silva и сар., 2011).

Највећи помак у коришћењу ДНК анализа за детерминацију пола код птица било је откривање присуства полно специфичних секвенци које су лоциране на полним Z и W хромозомима. Највећа могућност примене утврђена је за CHD ген. CHD ген је на W хромозому откривен 1995. године (Griffiths и Tiwari, 1995), док је на Z хромозому откривен од стране Griffiths и Korn (1997) две године касније. С обзиром на чињеницу да су кодирајуће секвенце овог гена високо конзервисане, није их могуће разликовати коришћењем хоризонталне електрофорезе (Fridolfsson и Ellegren, 1999). Међутим, интронски региони имају најважнију улогу у одређивању пола код птица, јер овај регион се брзо мења па је већа могућност детекције разлика унутар CHD гена. Највећу примену у одређивању пола има интрон који умножава сет прајмера 2550F/2718R (Fridolfsson и Ellegren, 1999). Ови прајмери имају могућност да се вежу за конзервисану егзонску секвенцу CHD гена која постоји на оба полна хромозома, али се као резултат амплификације добијају продукти (ампликони) различите величине уколико је ДНК пореклом од женке птица јер се дужина тог гена разликује на Z и W хромозомима због разлике у дужини интрона. Уколико је, пак, узорак од мужјака птице који има два иста (ZZ) полна хромозома, добиће се продукти исте величине који се визуелизују као једна трака на гелу. У даљем тексту, за CHD фрагмент на Z хромозому користиће се скраћеница CHD-Z алел, а за CHD фрагмент на W хромозому – CHD-W алел.

Од значаја је напоменути да је основна разлика између CHD-Z и CHD-W хромозома у томе што први хромозом има 88 аминокиселина које не поседује CHD-W (Griffiths и Korn, 1997). За разлику од сисара, еволуција полно везаних гена иде јако брзо, међутим исто није утврђено код CHD гена. Присуство CHD гена утврђено је код свих птица летачица, али и код тркачица (Palaeognathae). Међутим, када су у питању птице тркачице отежавајућа околност за примену CHD гена за одређивање пола је што код њих нису уочене разлике у величини полно специфичних секвенци на полним хромозомима (Garcia-Moreno и Mindell, 2000). Griffiths и сар. (1998) сматрали су да се овај ген налази и на полним хромозомима птица из реда Palaeognathae и да алели на Z и W нису исти, али недовољно да би се могли разликовати.

2.6. Идентификација врсте птица коришћењем молекуларно-генетичких метода

Идентификација врсте животиња углавном се користи у случајевима илегалног лова да би се утврдило порекло узорака који се могу пронаћи код осумњичене особе (Gupta и сар., 2005; Davitkov и сар., 2017). Такође, у великој мери се одређивање врсте користи за идентификацију биолошких трагова који су изгубили своје морфолошке карактеристике током трговине. Идентификација врсте, користећи генетичке методе, заснива се на изолацији и анализи ДНК маркера који показују велику варијабилност између врста, али су генерално конзервисани у оквиру врсте. Код животиња се најчешће употребљавају маркери митохондријалне ДНК, углавном секвенце гена за цитохром б (Parson и сар., 2000) и субјединицу 1 цитохром оксидазе (COI) (Hebert и сар., 2004).

У пракси се користи неколико техника за детерминацију врсте. Главна метода је секвенцирање ДНК, након чега следи поређење добијене секвенце са

секвенцама различитих врста доступних у *online* генској бази NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Секвенцирање обезбеђује утврђивање редоследа нуклеотида (аденинских, гуанинских, цитозинских и тиминских) у PCR продукту (односно амплификованом фрагменту ДНК који је предмет анализе). Ниво сличности између тестираних и референтних секвенци омогућава да се идентификује тражена врста. Посебна предност повезана са секвенцирањем је да се универзални PCR прајмери могу користити за амплификацију ДНК из широког спектра врста без претходних информација о пореклу узорка (Verma и Singh, 2003).

Примарни метод идентификације ДНК секвенце је путем претраживања референтне базе података, при чему се непозната секвенца упоређује са познатим узорцима (Parson и сар., 2000; Branicki и сар., 2003). Најчешће коришћене референтне базе података за компаративне претраге идентификације врста обезбеђују Национални центар за биотехнолошке информације (NCBI), Европска лабораторија за молекуларну биологију (EMBL), ДНК банка података у Јапану (DDBJ) и Баркод животи систем података (BOLD). За врсте које су у великој мери заступљене у бази података уобичајена појава је подударност секвенце 100% између непознатог узорка и његове референтне врсте. Међутим, услед варијација секвенци у оквиру врста, не може се видети тачно подударање, што резултира идентификацијом врсте на основу, нпр. 98,5% подударности. Уско повезане врсте могу имати секвенцу сличности од 90 до 95% или више (Ogden и сар., 2009). Укупна дужина секвенце која се подудара такође утиче на тачност идентификације. Приликом секвенцирања у једном смеру читава се редослед нуклеотида само са једног ланца ДНК и за тај процес довољан је један прајмер, који је комплементаран 3' крају једног ланца ДНК фрагмента чија се секвенца читава. Ако је потребна већа прецизност анализе, онда се обавља двосмерно секвенцирање (читавање оба ланца циљног ДНК фрагмента), али тада је потребан и други прајмер, који је комплементаран 3' крају другог ланца циљног ДНК фрагмента.

Најпознатија и највише коришћена дидеокси метода (коју је изумео Сангер па се зове и „метода секвенцирања по Сангеру“) захтева да се при *in vitro* синтези ДНК, поред нормалних градивних јединица (dNTP), додају и дидеоксинуклеотиди (ddNTP), који у пентозном шећеру немају ОН групе на позицијама 2' и 3', те се, након њиховог уграђивања у полинуклеотидни ланац, зауставља даља синтеза (јер нема слободне ОН групе на позицији 3' за коју би следећи нуклеотид требало да се веже). Зато се ова метода назива и „метода прекида синтезе ланца“.

Секвенцирањем се идентификује сваки нуклеотид у анализираном фрагменту ДНК. За идентификацију врсте углавном је потребно секвенцирање фрагмента ДНК од око 500 базних парова. Читав процес се одвија у секвенцеру, апарату који све ради аутоматски, од уношења узорача, до читања резултата. Раздвајање фрагмената се одвија капиларном електрофорезом на полиакриламидном гелу (који се улива у капиларне цеви) чиме се постиже изузетно висока резолуција, односно раздвајање једноланчаних ДНК фрагмената који се разликују у дужини за само један нуклеотид.

Секвенцирање омогућава и идентификацију најмањих генетичких промена и утврђивање молекуларних маркера, као што су полиморфизам појединачних нуклеотида (single nucleotide polymorphism - SNP), микросателити и инсерције, односно делеције (InDels- **insertion or deletion**).

SNP типизирање омогућава да се утврде варијабилна местау ДНК секвенци. Усмеравање на SNP омогућава брже и јефтиније тестове, који не захтевају тако дуге фрагменте висококвалитетне ДНК, али за коришћење SNP маркера услов је да се претходно уради секвенцирање ДНК.

Полиморфизам у дужини рестрикционих фрагмената (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) се ослања на способност ензима да секу ДНК на специфичним местима, која се називају „рестрикциона места“, унутар специфичних нуклеотидних секвенци. Тамо где се ове локације поклапају са SNP маркерима, неке секвенце ће бити исечене и довести до присуства два

фрагмента ДНК, док ће друге које не поседују рестрикционо место имати само један фрагмент, што доводи до разлика у броју и дужини фрагмената ДНК између узорака (Davitkov и сар., 2015). Ове разлике се могу визуелизовати коришћењем гел електрофорезе. На тај начин, уколико је у ампликону постојало једно рестрикционо место, на гелу ће се видети две траке, уколико је сечење обављено на два места, појавиће се три траке, а уколико није било рестрикционих места, ампликон ће остати цео (једна трака).

Прајмери који се користе за амплификацију генетичких маркера могу бити дизајнирани за конзервиране регионе ДНК (универзални прајмери) или регионе где се алели разликују између врста или популација (алел специфични прајмери). Алел специфични прајмери су дизајнирани тако да PCR функционише само када је ДНК из циљне секвенце присутна у узорку.

Алтернатива употреби специфичних прајмера је употреба универзалних прајмера. Различите пробе су дизајниране тако да се вежу на различите варијанте секвенци ДНК (C1 и C2), чиме се омогућава детекција базе присутне на SNP месту.

Микросателитни маркери су кратке јединице ДНК које се више пута понављају у тандему. Величина јединице (поновка) је од 2 до 6 базних парова. Најчешће поновљена јединица (поновак) је СА. Микросателити су хиперваријабилни, често имају десетине алела по локусу, при чему се различити алели разликују по броју поновака. Микросателити су распоређени по читавом геному, зову се и STR маркер локуси ("Short Tandem Repeat - STR loci").

Микросателити описују разлике између ДНК секвенци због варијација у броју понављајућих јединица ДНК (поновака) у одређеном региону. Разлике у броју поновака су узрок разлика у величини ДНК фрагмената (алела) који се могу раздвојити и визуелизовати искључиво вертикалном електрофорезом на полиакриламодном гелу, која се већ деценијама обавља у апаратима за

секвенцирање коришћењем капиларне електрофорезе и програма за анализу фрагмената.

Потврда родитељства помоћу маркера високе резолуције, као што су ДНК микросателити, може недвосмислено утврдити да ли је тврдња о пореклу истинита. Упркос потенцијалу форензике у истраживању дивљих животиња, имплементација таквих анализа код птица је до сада била ограничена из бројних разлога. Прво, број генетичких маркера (тј. микросателита) посебно развијених за угрожене врсте је низак, са ограниченом употребом маркера развијених на другим врстама (унакрсна амплификација), као и честим губитком специфичности маркера и резолуције, због чега је упитна и статистичка валидност (Presti и Vasko, 2014). Друго, стопа успешности у изоловању микросателита из папагаја углавном је била ниска (Hughes и сар., 1998). Треће, због изузетне реткости и због потешкоћа у узорковању неких врста, састављање база података ДНК популације за израчунавање статистичке сигурности је веома тежак и изазован задатак.

Примена –микросателитских или STR маркера као молекуларни показатеља за идентификацију животиња и верификацију родитељства се показала као ефикасна метода у рутинској примени и форензичком раду (Iyengar и Hadi, 2014). STR панели су углавном дефинисани за домаће животиње, нарочито за оне које су економски исплативе, као и за аутохтоне расе у циљу њихове конзервације, на пример за говеда расе буша (Stevanov-Pavlovic 2015) аутохтоне расе магараца (Stanisic и сар., 2017).

Светске организације *Food and Agriculture Organization (FAO)* и *International Society for Animal Genetics (ISAG)* препоручују листе аутозомалних микросателитских маркера за проучавање генетичког диверзитета већине врста од интереса за сточарство на основу научних истраживања из целог света, на пример за бик (*Bos Taurus*) и коњ (*Equus caballus*) и за мање животињске врсте, као што су домаћа мачка (*Felis catus*) и пас (*Canis lupus familiaris*) (Lipinski и сар., 2007; Ciampolini и сар., 2012).

У новијим студијама о домаћим голубовима (Biała и сар., 2015) седам STR маркера је тестирано у комбинацији са претходно необјављеним STR маркерима. На основу ових студија, панел са 16 STR предложен је као нова препорука Међународног друштва за генетику животиња (ISAG) за идентификацију голубова.

3. Циљ и задаци рада

Циљеви спроведених истраживања су следећи:

1. Развијање молекуларно - генетичке методе анализе CHD гена којом би се омогућило одређивање врсте птице;
2. Дефинисање молекуларно-генетичке методе за одређивање пола птица, која је поузданија у односу на постојеће, и која омогућава одређивање пола код врста код којих се то не може учинити PCR анализом праћеном хоризонталном електрофорезом на агарозном гелу;
3. Утврђивање молекуларне и генетске сличности међу различитим врстама птица и уношење добијених секвенци у електронску базу података;
4. Дизајнирање прајмера на основу добијене секвенце за изабрану врсту птица, њихова провера и могућност коришћења.

Да би се остварили циљеви, постављени су следећи задаци:

1. Узорковање три до пет пера од птица са предела грудне мускулатуре од стране обученог особља на које су птице научене. Узорци ће се узимати од птица из Зоолошког врта града Београда, од угинулих заштићених врста птица које су обдуковане на Катедри за судску ветеринарску медицину и законске прописе Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду (ФВМ УБ) и из архиве Катедре за биологију ФВМ УБ;
2. Изолација ДНК применом комерцијалног сета, провера приноса укупне ДНК након изолације уз помоћ наноспектрофотометра, PCR амплификација и провера присуства продукта методом гел електрофорезе;

3. Сепарација и визуелизација PCR ампликона методом капиларне електрофорезе којом се сегменти ДНК раздвајају на основу величине;
4. Секвенцирање пурификованих продуката, као и њихова анализа;
5. Креирање нових прајмера на основу добијених секвенци за изабрану врсту;
6. Обрада и анализа добијених резултата у циљу извођења закључака.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Материјал - прикупљање узорака

Прикупљање узорака извршено је у периоду мај 2017. године – мај 2018. године. Највећи број узорака прикупљен је у Зоолошком врту града Београда. Други део узорака је коришћен из архиве Лабораторије за генетику животиња на Катедри за биологију, Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду (ФВМ УБ). Такође, узорци су узимани од угинулих птица које су обдуковане на Катедри за судску ветеринарску медицину и законске прописе ФВМ УБ. При одабиру се тежило узимању узорака од оних врста птица које су у највећој мери изложене илегалној трговини и злоупотреби, као и од строго заштићених и заштићених врста у Републици Србији. Такође, узимани су и узорци врста птица које су заштићене и међународним актима, а могу се наћи у Републици Србији. Циљ узорковања је био да се обухвати што већи број врста из различитих редова. Узорци потичу од 47 врста из 14 фамилија и 9 редова. Списак редова, фамилија и врста птица од којих су узети узорци приказан је у Табели 4.

Од сваке јединке је узорковано искључиво перје са грудне мускулатуре, и то три до пет пера заједно са каламусом. Фиксацију живих птица обављала су стручна лица, на које су животиње навикле, проузрокујући минималан ниво стреса.

Након чупања пера са грудне мускулатуре, пера су пакована у PVC кесице са зип затварачем и обележавана адекватним ознакама/бројевима. После сваког узорковања мењане су рукавице са којима су узимана пера. При манипулацији са пером није додириван каламус где се и налазе ћелије са ДНК. На тај начин избегнута је контаминација, деградација и мешање узорака. Сви узорци су транспортовани у фрижидеру и складиштени на ниским температурама (до -20°C) до коришћења у анализама.

Екстракција и амплификација ДНК, као и гел електрофореза обављена је у Лабораторији за генетику животиња, ФВМ УБ. Капиларна електрофореза

обављена је у Националном криминалистичко-техничком центру Министарства унутрашњих послова Републике Србије и то на Одељењу за ДНК анализу и вођење базе ДНК профила. Секвенцирање пурификованих секвенци обављено је коришћењем комерцијалне услуге фирме Microgen, а дизајнирани прајмери добијени су коришћењем комерцијалне услуге фирме Vivogen.

Табела 4. Врсте птица од којих је узрокован материјал

Ред и фамилија	Врста (латински назив)	Врста (српски назив)
Strigiformes		
Tytonidae	<i>Tyto alba</i>	Кукувија
Strigidae	<i>Glaucidium passerinum</i>	Мала сова
	<i>Athene noctua</i>	Кукумавка
	<i>Bubo bubo</i>	Буљина
	<i>Strix aluco</i>	Шумска сова
Accipitriformes		
Accipitridae	<i>Buteo buteo</i>	Обични мишар
	<i>Haliaeetus albicila</i>	Орао белорепан
	<i>Neophron percnopterus</i>	Бела кања
	<i>Accipiter nisus</i>	Обични кобац
	<i>Accipiter gentilis</i>	Јастреб
	<i>Gyps fulvus</i>	Белоглави суп
	<i>Aquila heliaca</i>	Орао крсташ
Falconidae	<i>Falco tinnunculus</i>	Ветрушка
Psittaciformes		
Psittacidae	<i>Amazona albifrons</i>	Белочели амазонац
	<i>Amazona barbadensis</i>	Жуторамени амазонац
	<i>Amazona venezuele</i>	Венецуелански амазонац
	<i>Amazona nestora</i>	
	<i>Amazona aestiva</i>	Плавочели амазонац
	<i>Amazona finchi</i>	Љубичасточели амазонц
	<i>Amazona ochrocephala</i>	Жуточели амазонац
	<i>Amazona albigena</i>	
	<i>Ara ararauna</i>	Плавожута ара
	<i>Ara chloroptera</i>	Зелено црвена ара
	<i>Ara macao</i>	Ара макао
	<i>Ara nobilis</i>	Црвенорамена ара
	<i>Pssitacus erithacus</i>	Жако

	<i>Polytelis swainsonii</i>	Барабандов папагај
	<i>Pyrrhura molinae</i>	Зеленообрази папагај
	<i>Pyrrhura conura</i>	
	<i>Pionites melanocephala</i>	Црноглави папагај
Cacatuidae	<i>Cacatua moluccensis</i>	Молучански какаду
	<i>Cacatua alba</i>	Белоћуби какаду
	<i>Cacatua sulphurea</i>	Жутоћуби какаду
Anseriformes		
Anatidae	<i>Anas platyrhynchos</i>	Дивља патка
	<i>Cygnus cygnus</i>	Велики лабуд
	<i>Tadorna ferruginea</i>	Златокрила утва
Ciconiidae	<i>Ciconia ciconia</i>	Бела рода
Passeriformes		
Fringillidae	<i>Carduelis spinus</i>	Чижак
	<i>Carduelis carduelis</i>	Чешљугар
Muscicapidae	<i>Luscinia megarhynchos</i>	Мали славуј
Galliformes	<i>Phasianus colchicus</i>	Фазан
Phasianidae	<i>Coturnix coturnix</i>	Препелица
	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Кокошка
	<i>Pavo cristatus</i>	Паун
Phoenicopteriformes		
Phoenicopteridae	<i>Phoenicopus roseus</i>	Фламинго
Columbiformes		
Columbidae	<i>Columba livia</i>	Голуб пећинар
Charadriiformes		
Scolopacidae	<i>Scolopax rusticola</i>	Шумска шљука

4.2. МЕТОДЕ

4.2.1. Екстракција ДНК из пера

Екстракција ДНК из пера извођена је коришћењем изолационог кита под називом „КАРА Express Extract Kit” (Cat. No KK7152, Кара Biosystems, Cape Town, South Africa). Екстракција ДНК подразумевала је следеће:

1. У сваку епрувету, чија је запремина била 1,5 ml, од сваког пера узет је каламус димензија око 3 mm који је стављен у епрувету запремине 1,5 ml; сваки узорак је потицао од три пера, да би се обезбедила довољна количина ДНК;
2. У епрувету са каламусом додато је 50 μ l пуфера и 2 μ l ензима;
3. Садржај епрувете је вортексован 10 секунди;
4. Епрувета са узорцима је затим стављана у водено купатило на температуру од 75°C и то у трајању од 30 мин; након тога епрувета је остала у воденом купатилу још 5 мин, на већој температури (95°C);
5. Садржај је промешан на вортекс машини;
6. У следећем кораку вршено је центрифугирање узорка у трајању од једног минута на максималној брзини центрифуге на 13.000 rpm;
7. У припремљене епрувете запремине 1,5 ml додато је између 30 и 50 μ l ДНК изолата;
8. У циљу адекватног чувања изолата ДНК вршено је разређивање у ТЕ пуферу (1:5). Овако разређен узорак ДНК чуван је на ниским температурама (-20 °C).

4.2.2. PCR амплификација

Амплификован је сегмент величине приближно 600 базних парова који се налази на Z хромозому, као и сегмент чија је приближна величина од око 450 базних парова који је лоциран на W хромозому. За амплификацију жељеног фрагмента изабран је сет прајмера 2550F и и 2718R, који су први пут описани 1999. године од стране Fridolfsson и Ellegren (2550F: 5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'; 2718R: 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3').

За PCR реакцију коришћен је сет произвођача који се налази у комерцијалној употреби под називом „KAPA2G Robust HotStart ReadyMix“ (Cat. No KK7152, Кара Biosystems, Cape Town, South Africa). Укупан волумен реакције за PCR износио је 25 µl садржаја и то: 12.5 µl „KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (2X)“, 1.25 µl једног прајмера, 1.25 µl другог прајмера и 10 µl ДНК изолата. PCR реакција се одвијала у апарату „MultiGeneGradientThermal Cycler“ (LabnetInternationalInc., USA) по програму приказаном у Табели 5.

Табела 5. Програм за термални протокол PCR реакције

1. Почетна денатурација	95 °C	3 минута
2. Денатурација	95 °C	15 секунди*
3. Хибридизација	52 °C	15 секунди*
4. ДНК екстензија	72 °C	15 секунди*
5. Финална екстензија	72 °C	8 минута

*Кораци два, три и четири поновљени су укупно 40 пута.

4.2.3. Гел електрофореза и визуелизација PCR продуката

Добијени PCR продукти затим су анализирани на агарозном гелу методом хоризонталне електрофорезе. За електрофорезу коришћен је двоцентни агарозни гел. Припремљени агарозни гел је након хлађења преливен у каду у којој се врши електрофореза. У свако формирано место за узорке унесена је смеша која је подразумевала 3 μ l продукта PCR реакције и 1 μ l боје 6 x Loading Dye Solution (Fermentas). У први и у последњи бунар за узорке стављен је комерцијални маркер величине 100 bp у количини од 2 μ l (O'RangeRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas, USA). Гел је преливен са 50 ml 1x TBE пуфера. Електрофореза је трајала 45 минута, струја која се користила била је јачине 50 mA, а подешени напон је износио 50 V (Carl ROTH N817.1 minieasy Electrophoresis Unit, Carl Roth, Germany). За успешну визуелизацију анализираних узорака методом гел електрофорезе, гел је потапан у етидијум-бромид у трајању од 10 минута, а затим испиран дестилованом водом у трајању од 5 минута. Захваљујући етидијум бромиду гел је визуелизован коришћењем UV светла трансилуминатора (Vilber lourmat – ETX-20.C 254 nm, Vilber lourmat, France).

4.2.4. Капиларна електрофореза

Два пара прајмера, CHD1F/CHD1R и P2/P8 су коришћена за амплификацију фрагмената CHD гена (Табела 6). Пар прајмера CHD1F/CHD1R дизајниран је из продукта секвенце 2550F/2718R (Lee и сар., 2010) одређене код 58 различитих врста птица. Прајмери P2/P8 су преузети од Griffiths и сар. (1998).

Табела 6. Табеларни приказ коришћених прајмера

Први пар		Аутори
CHD1F	5'-TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT-3'	Fridolfsson и сар., 1999.
CHD1R	5'-CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT-3'	Fridolfsson и сар., 1999.
Други пар		
P2	5'- TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'	Griffiths и сар., 1998.
P8	5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG -3'	Griffiths и сар., 1998.

Прајмери CHD1F и P8 су обележени флуоресцентним бојама FAM, односно VIC. PCR амплификација је извођена у реакционој смеши запремине 10 µl, која је садржала 1–5 ng геномске ДНК 1x ST (Super-Therm) пуфера (Bertec Enterprise Co., Taipei, Taiwan), 10 mM dNTPs, 0.5 јединица ST Taq DNA полимеразе и 10 mM сваког прајмера. Амплификација је обављена у апарату „2400 Applied Biosystems thermal cycler“ (Applied Biosystems, UK), а термални протокол приказан је у Табели 7.

Табела 7. Температурни протокол за PCR реакцију

1. Почетна денатурација	95 °C	5 минута
2. Денатурација	94 °C	30 секунди*
3. Хибридизација	48 °C	30/45 секунди*, **
4. ДНК екстензија	72 °C	15 секунди*
5. Финална екстензија	72 °C	5 минута

*Кораци два, три и четири су поновљени 30 пута

**Хибридизација је трајала 30 секунди када су били коришћени CHD1F/CHD1R прајмери, а 45 секунди када су коришћени P2/P8 прајмери

PCR продукти обележени флуоресцентним бојама одвајани су помоћу POP-4 полимера (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Framingham, MA) у капилари од 50 cm и детектовани су коришћењем ABI 3100 DNK анализатора (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, California). Као стандард дужине фрагмената (*size standard*) коришћен је LIZ500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Warrington, UK).

4.2.5. Секвенцирање пурификованих секвенци

За 9 узорака пореклом од врста: *Bucorvus leadbeateri*, *Neophron percnopterus*, *Balearica regulorum*, *Ara ararauna*, *Cacatua moluccensis*, *Cacatua alba*, *Pionites melanocephala*, *Milvus milvus* и *Amazona farinosa*, осим анализе фрагмената капиларном електрофорезом, а у циљу добијања детаљнијих информација о ампликонима са CHD1 гена, извршено је њихово секвенцирање.

После амплификације са прајмерима 2550F и 2718R, PCR продукти су одвојени хоризонталном електрофорезом на 1,8% агарозном гелу и екстраховани коришћењем Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Orange, CA.) *Forward* и *reverse* прајмери су секвенцирани помоћу BigDyeTerminator V3 и анализирани методом капиларне електрофорезе ABI3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Добијене секвенце су депоноване у NCBI *online* генску базу и за њих су добијени приступни бројеви.

4.2.6. Креирање новог пара прајмера

Након секвенцирања пречишћених PCR продуката амплификованог CHD региона, од добијених резултата креирани су нови прајмери добијени анализом и обрадом секвенци пореклом од врсте *Cacatua alba* коришћењем *online* NCBI програма. Програм омогућава да уношењем секвенце добијеног PCR продукта предложи специфичан прајмер, као и претпостављену температуру топљења прајмера.

Сви прајмери су пре употребе били у лиофилизованом стању, а затим су растворени према упутству произвођача са *nuclease free* водом. Растворени прајмери су чувани на температури -20°C до употребе. Да би се утврдила њихова ефикасност и апликативност, растворени прајмери су испробани на већем броју узорака од исте врсте.

PCR амплификација извођена је у реакционим смешама запремине 25 μl и 12.5 μl . За реакциону смешу чија је запремина била 25 μl коришћено је следеће: 12.5 μl КАРА2G Robust HotStart ReadyMix (2X) (Cat. No KK5601, Кара Biosystems, Cape Town, South Africa), укупно 2.5 μl прајмера (по 1.25 μl сваког прајмера), 5 μl *nuclease free* воде и 5 μl изоловане ДНК. За реакциону смешу чија је запремина била 12.5 μl коришћено је следеће: 5 μl КАРА2G Robust HotStart ReadyMix (2X), 0,7 μl сваког прајмера, 1,25 μl *nuclease free* воде и 5 μl изоловане ДНК. Протокол хибридизације вршен је у анализатору „MultiGeneGradient Thermal Cycler“ (Labnet International Inc., USA) и приказан је у Табели 8.

Табела 8. Температурни протокол за PCR реакцију

1. Почетна денатурација	95 °C	3 минута
2. Денатурација	95 °C	15 секунди*
3. Хибридизација	48-55 °C	15 секунди*
4. ДНК екстензија	72 °C	15 секунди*
5. Финална екстензија	72 °C	8 минута

*Кораци два, три и четири поновљени су 40 пута.

4.2.7. Статистичка обрада података

Статистичка обрада експерименталних података је извршена коришћењем софтвера GraphPad Prism верзија 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA). У циљу одређивања сензитивности и специфичности теста са 95% интервалом поверења коришћен је Фишеров тест. Вредности позитивне и негативне предикције су такође израчунате. Одрађени статистички резултати односе се на методу капиларне електрофорезе и гел електрофорезе.

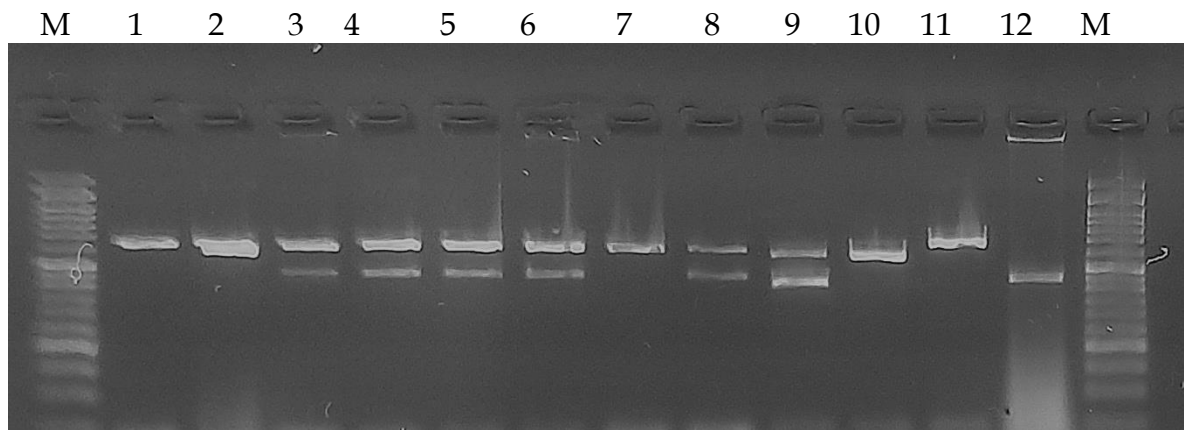
5. РЕЗУЛТАТИ

За све прикупљене узорке формиран је табеларни приказ који показује степен заштићености врста, а који укључује: да ли су животиње заштићене по CITES конвенцији (и у ком прилогу се налазе), да ли су уврштене у Бонску конвенцију, како су дефинисане на Црвеној листи, као и да ли се налазе у нормативним актима Републике Србије и на који начин је дефинисана њихова заштита (Прилог 1).

5.1. Резултати гел електрофорезе

Код свих птица пре анализирања узорака методом капиларне електрофорезе вршена је детерминација пола коришћењем 2550F/2718R и P2/P8 пара прајмера. Детерминација је рађена код 71 јединке, при чему је обухваћено укупно 47 врста из 9 редова и 14 фамилија.

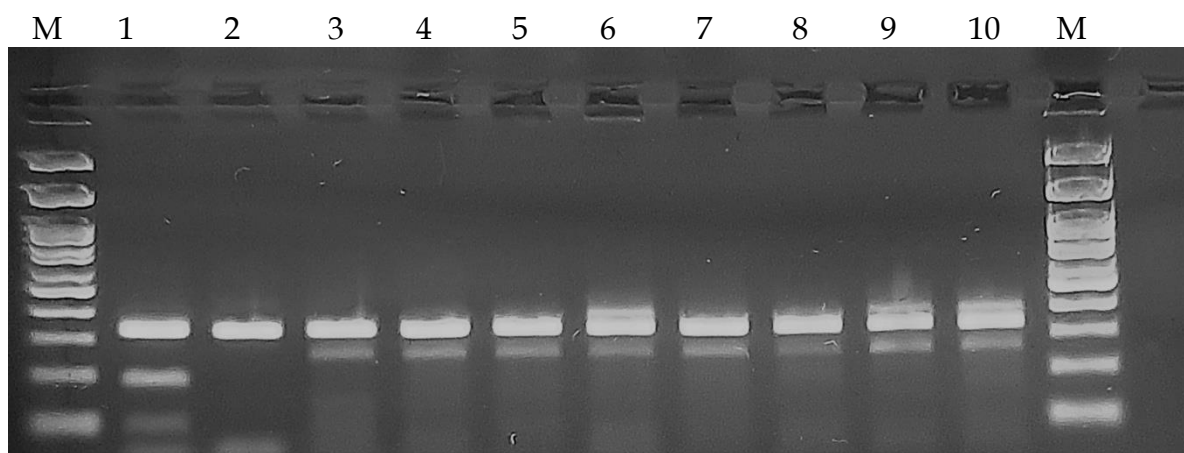
Резултати анализа применом 2550F/2718R пара прајмера показали су се успешним код 60 јединки (Слика 2). Детерминација пола коришћењем 2550F/2718R пара прајмера није била успешна (добилијени резултати нису могли са сигурношћу да потврде да ли је у питању мужјак или женка) код укупно 5 јединки које припадају реду *Strigiformes* (врсте *Tyto alba*, *Athene noctua*, *Bubo bubo*, *Glaucidium passerinum* и *Strix aluco*).



Слика 2. Резултати гел електрофорезе анализираних узорака птица коришћењем 2550F/2718R пара прајмера

М - маркер (од 50 базних парова); Узорци: 1 - *Ara chloroptera* (♂); 2 - *Ara ararauna* (♂); 3 - *Amazona aestiva* (♀); 4 - *Amazona venezuele* (♀); 5 - *Pyrrhura molinae* (♀); 6 - *Cacatua sulphurea* (♀); 7- *Psittacus erithacus*(♂); 8 - *Psittacus erithacus* (♀); 9 - *Numida meleagris* (♀); 10 - *Numida meleagris* (♂); 11 - *Gyps fulvus* (♂); 12 - *Pavo cristatus* (♂)

Када је у питању примена P2/P8 пара прајмера код свих испитиваних узорака било је тешко да се са сигурношћу утврди пол, што се може видети и на слици 3 где су производи амплификације приближно исте величине.



Слика 3. Резултати гел електрофорезе испитиваних узорака птица коришћењем P2/P8 пара прајмера

М- маркер; Узорци: 1 - *Carduelis spinus* (♂); 2 - *Carduelis spinus* (♂); 3 - *Carduelis cardelius* (♂); 4 - *Carduelis cardelius* (♂); 5 - *Carduelis cardelius* (♂); 6 - *Luscinia megarhynchos* (♀/♂); 7 - *Luscinia megarhynchos* (♂); 8 - *Cardelius cannabina* (♂); 9 - *Carduelis cardelius* (♀/♂); 10 - *Carduelis cardelius* (♀/♂)

5.2. Резултати капиларне електрофорезе

За амплификацију CHD региона уместо 2550F/2718R коришћен је сет прајмера CHD1F/CHD1R. Употреба CHD1F/CHD1R сета прајмера резултирала је успешном амплификацијом фрагмената специфичних за врсту, омогућавајући њихову идентификацију, као и полно специфичних фрагмената, што омогућава одређивање пола јединки.

PCR производи су добијени за све анализиране узорке користећи прајмере CHD1F/CHD1R (Табела 9). Производи амплификације исте величине забележени су код 26 прикупљених узорака (који су указивали на мушки пол), док су два производа амплификације различите величине откривена у 39 узорака (који су указивали на женски пол). Ампликони са Z хромозома (CHD1-Z ампликон) били су већи код свих тестираних узорака у поређењу са величином ампликона са W хромозома (CHD1-W ампликон). Иста дужина CHD1-Z ампликона била је присутна у свим узорцима прикупљеним од исте врсте птица. Једини изузеци биле су птице које припадају врсти *Buteo buteo*, где је разлика била само три базна пара (566 и 563 bp) и *Cygnus cygnus*, где је разлика била само један базни пар. Дужина CHD1-W ампликона била је иста за све узорке, осим за оне пореклом из врста *Tyto alba*, где је за први узорак величина била 471 bp, а за други 475 bp. Најмања разлика у дужини између CHD1-Z и CHD1-W ампликона примећена је код птица из реда Strigiformes.

Иста величина CHD1-Z ампликона откривена је у неким узорцима пореклом од различитих врста, али углавном из истог реда или чак породице. Међутим, у тим узорцима (од различитих врста, али са истом дужином CHD1-Z ампликона), CHD1-W ампликони били су различите величине, изузев код врста *Ara ararauna* и *Purpuricephalus spurius* (Z - 518 bp и W - 329 bp).

Табела 9. Дужина CHD1-Z и CHD1-W ампликона добијених коришћењем CHD1F/CHD1R сега прајмера

№	Врста	Ред	CHD1F_R_Z (bp)	CHD1F_R_W (bp)
1	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Galliformes	466	
2	<i>Gallus gallus domesticus</i>		466	322
3	<i>Pavo cristatus</i>		460	316
4	<i>Pavo cristatus</i>		460	
5	<i>Phasianus colchicus</i>		465	319
6	<i>Phasianus colchicus</i>		465	
7	<i>Anas platyrhynchos</i>	Anseriformes	443	
8	<i>Anas platyrhynchos</i>		443	327
9	<i>Ciconia ciconia</i>		540	336
10	<i>Cygnus Cygnus</i>		455	
11	<i>Cygnus Cygnus</i>		454	351
12	<i>Tadorna ferruginea</i>		445	
13	<i>Tadorna ferruginea</i>	445	340	
14	<i>Phoenicopterus roseus</i>	Phoenicopteriformes	540	
15	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	524	
16	<i>Columba livia</i>		524	328
17	<i>Tyto alba</i>	Strigiformes	513	471
18	<i>Tyto alba</i>		513	475
19	<i>Athene noctua</i>		529	
20	<i>Athene noctua</i>		529	427
21	<i>Bubo bubo</i>		521	

22	<i>Glaucidium passerinum</i>		530	471
23	<i>Strix aluco</i>		329	
24	<i>Buteo buteo</i>	Accipitriformes	566	
25	<i>Buteo buteo</i>		563	329
26	<i>Accipiter nisus</i>		545	329
27	<i>Falco tinnunculus</i>		526	
28	<i>Falco tinnunculus</i>		526	339
29	<i>Aquila heliaca</i>		525	246
30	<i>Neophron percnopterus</i>		556	328
31	<i>Neophron percnopterus</i>		556	
32	<i>Gyps fulvus</i>		536	
33	<i>Haliaeetus albicilla</i>		600	329
34	<i>Haliaeetus albicilla</i>		600	329
35	<i>Accipiter gentilis</i>		514	
36	<i>Ara ararauna</i>		Psittaciformes	518
37	<i>Ara ararauna</i>	518		
38	<i>Ara chloroptera</i>	521		332
39	<i>Ara macao</i>	521		371
40	<i>Ara nobilis</i>	519		
41	<i>Ara moluccensis</i>	515		
42	<i>Cacatua sulphurea</i>	514		457
43	<i>Cacatua alba</i>	514		308
44	<i>Amazona barbadensis</i>	427		
45	<i>Amazona venezuela</i>	525		
46	<i>Amazona venezuela</i>	525		329
47	<i>Amazona nestora</i>	522	358	

48	<i>Amazona aestiva</i>		520	
49	<i>Amazona aestiva</i>		520	329
50	<i>Amazona finschi</i>		526	330
51	<i>Amazona finschi</i>		526	330
52	<i>Amazona ochrocephala</i>		520	395
53	<i>Amazona ochrocephala</i>		520	395
54	<i>Amazona albigena</i>		526	324
55	<i>Pyrrhura molinae</i>		523	330
56	<i>Pyrrhura molinae</i>		523	
57	<i>Pyrrhura conura</i>		524	
58	<i>Pyrrhura conura</i>		524	329
59	<i>Pionites melanocephala</i>		518	
60	<i>Pionites melanocephala</i>		518	328
61	<i>Amazona leucocephala</i>		525	358
62	<i>Polytelis swansonii</i>		513	473
63	<i>Pssitacus erithacus</i>		512	329
64	<i>Pssitacus erithacus</i>		512	
65	<i>Amazona albifrons</i>		526	329

Уместо CHD1F/CHD1R сета прајмера за птице из реда Passeriformes, коришћен је P2/P8 сет прајмера, који је према Lee и сар. (2010) прикладнији за анализу узорака пореклом од ових врста.

PCR продукти су добијени за све анализиране узорке коришћењем сета прајмера P2/P8 (Табела 10). Продукти амплификације исте величине забележени су код три прикупљена узорка (који су указивали на мушки пол), док су продукти амплификације различите величине откривени код три узорка (који су указивали на женски пол). CHD1-Z ампликони били су мањи код свих тестираних узорака у поређењу са величином CHD1-W ампликона. Иста дужина CHD1-Z ампликона била је присутна у свим узорцима прикупљеним од исте врсте птица.

Иста величина CHD1-Z ампликона (329 bp) утврђена је у узорцима пореклом из различитих врста, али из истог рода (*Carduelis spinus* и *Cardelius cardelius*). Међутим, у тим узорцима, CHD1-W ампликони били су различите величине (384 bp и 387 bp).

Табела 10. Дужина CHD1-Z и CHD1-W фрагмената амплификованих са P2/P8 сетом прајмера

Врста	Ред	CHD1F_R_Z	CHD1F_R_W
<i>Carduelis spinus</i>	Passeriformes	329 bp	
<i>Carduelis spinus</i>		329 bp	384 bp
<i>Luscinia megarhynchos</i>		348 bp	381 bp
<i>Luscinia megarhynchos</i>		348 bp	
<i>Cardelius cardelius</i>		329 bp	387 bp
<i>Scolopax rusticola</i>	Charadriiformes	521 bp	

У табели 11. упоредно су приказани резултати пола добијени капиларном електрофорезом и гел електрофорезом. Код укупно 61 узорка птица резултати ове две методе су се поклапали. Код врста из реда Strigiformes уочене су разлике у добијеним резултатима, односно гел електрофореза је показала да су у питању мушке једнике, док је капиларна електрофореза показала да су у питању женке.

Табела 11. Упоредни резултати утврђивања пола добијени капиларном и гел електрофорезом коришћењем CHD1F/CHD1R сета прајмера

№	Врста	Ред	Пол одређен капиларном електрофорезом	Пол одређен гел електрофорезом
1	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Galliformes	M	M
2	<i>Gallus gallus domesticus</i>		F	F
3	<i>Pavo cristatus</i>		F	F
4	<i>Pavo cristatus</i>		M	M
5	<i>Phasianus colchicus</i>		F	F
6	<i>Phasianus colchicus</i>		M	M
7	<i>Anas platyrhynchos</i>	Anseriformes	M	M
8	<i>Anas platyrhynchos</i>		F	F
9	<i>Ciconia ciconia</i>		F	F
10	<i>Cygnus cygnus</i>		M	M
11	<i>Cygnus cygnus</i>		F	F
12	<i>Tadorna ferruginea</i>		M	M
13	<i>Tadorna ferruginea</i>		F	F
14	<i>Phoenicopterus roseus</i>		M	M
15	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	M	M
16	<i>Columba livia</i>		F	F

17	<i>Tyto alba</i>	Strigiformes	F	M
18	<i>Tyto alba</i>		F	M
19	<i>Athene noctua</i>		M	M
20	<i>Athene noctua</i>		F	M
21	<i>Bubo bubo</i>		M	M
22	<i>Glaucidium passerinum</i>		F	M
23	<i>Strix aluco</i>		M	M
24	<i>Buteo buteo</i>	Falconiformes	M	M
25	<i>Buteo buteo</i>		F	F
26	<i>Accipiter nisus</i>		F	F
27	<i>Falco tinnunculus</i>		M	M
28	<i>Falco tinnunculus</i>		F	F
29	<i>Aquila heliaca</i>		F	F
30	<i>Neophron percnopterus</i>		F	F
31	<i>Neophron percnopterus</i>		M	M
32	<i>Gyps fulvus</i>		M	M
33	<i>Haliaeetus albicila</i>		F	F
34	<i>Haliaeetus albicila</i>		F	F
35	<i>Accipiter gentilis</i>	M	M	
36	<i>Ara ararauna</i>	Psittaciformes	F	F
37	<i>Ara ararauna</i>		M	M
38	<i>Ara chloroptera</i>		F	F
39	<i>Ara macao</i>		F	F
40	<i>Ara nobilis</i>		M	M
41	<i>Ara moluccensis</i>		M	M
42	<i>Cacatua sulphurea</i>		F	F

43	<i>Cacatua alba</i>		F	F
44	<i>Amazona barbadensis</i>		M	M
45	<i>Amazona venezuela</i>		M	M
46	<i>Amazona venezuela</i>		F	F
47	<i>Amazona nestova</i>		F	F
48	<i>Amazona aestiva</i>		M	M
49	<i>Amazona aestiva</i>		F	F
50	<i>Amazona finschi</i>		F	F
51	<i>Amazona finschi</i>		F	F
52	<i>Amazona ochrocephala</i>		F	F
53	<i>Amazona ochrocephala</i>		F	F
54	<i>Amazona albigena</i>		F	F
55	<i>Pyrrhura molinae</i>		F	F
56	<i>Pyrrhura molinae</i>		M	M
57	<i>Pyrrhura conura</i>		M	M
58	<i>Pyrrhura conura</i>		F	F
59	<i>Pionites melanocephala</i>		M	M
60	<i>Pionites melanocephala</i>		F	F
61	<i>Amazona leucocephala</i>		F	F
62	<i>Polytelis swansonii</i>		F	F
63	<i>Pssitacus erithacus</i>		F	F
64	<i>Pssitacus erithacus</i>		M	M
65	<i>Amazona albifrons</i>		F	F

У табели 12. приказани су резултати пола добијени капиларном електрофорезом и гел електрофорезом користећи сет прајмера P2/P8. Код врста из реда Passeriformes уочене су разлике у добијеним резултатима, односно гел електрофореза није дала адекватне резултате који могу бити тачно интерпретирани (женске јединке су имале по једну траку на агарозном гелу), док је капиларна електрофореза показала недвосмислене резултате.

Статистичком анализом добијених резултата, коришћењем Фишевог теста, уочена је статистички значајна разлика између методе капиларне електрофорезе и методе гел електрофорезе ($p < 0,05$). Такође, статистичка анализа је показала да је сензитивност теста била 100% (0,88-1), а специфичност теста 0,83 (0,69-0,92). Вредност позитивне предикције износила је 80% (0,69-0,92), а вредност негативне предикције 100% (0,90-1).

Табела 12. Упоредни резултати утврђивања пола добијени капиларном и гел електрофорезом коришћењем P2/P8 сета прајмера

№	Врста	Ред	Пол одређен капиларном електрофорезом	Пол одређен гел електрофорезом
1	<i>Carduelis spinus</i>	Passeriformes	М	М/Ф
2	<i>Carduelis spinus</i>		Ф	М/Ф
3	<i>Cardelius cardelius</i>		Ф	М/Ф
4	<i>Luscinia megarhynchos</i>		М	М/Ф
5	<i>Luscinia megarhynchos</i>		Ф	М/Ф
6.	<i>Scolopax rusticola</i>	Charadriiformes	М	М/Ф

5.3. Резултати добијени секвенцирањем

Укупно је извршено секвенцирање 11 секвенци, које припадају девет различитих врста птица (Табела 13). Све секвенце су анализирани, обрађене и депоноване у NCBI генску базу података и за њих су добијени приступни бројеви (Табела 14). Такође, све врсте као и аутори који су их описали табеларно су приказане (Табела 15). Након анализа поређено је преклапања наведених секвенци са секвенцама које су већ биле доступне у NCBI генској бази.

Анализом дела секвенце CHD гена на Z хромозому, добијене од врсте лидбитеров кљунорог (*Bucorvus leadbeateri*), утврђено је да је секвенца дужине 669 базних парова и пронађено је 98 секвенци са сличним поравнањима. Од укупног броја секвенци најнижа E вредност и највећи степен преклапања (90,40%) је са врстом *Spheniscus magellanicus*, код које је такође анализиран CHD-Z хромозом. Анализом дела секвенце CHD гена на W хромозому, такође код врсте *Bucorvus leadbeateri*, утврђена је дужина секвенце од 458 базних парова. Пронађене су 92 секвенце са сличним поравнањима, с тим да је најнижа E вредност (0,0) и највећи степен преклапања (93,06%) уочен са врстом *Phalacrocorax carbo*. Код наведене врсте је такође анализиран CHD ген на W хромозому.

Анализом дела секвенце CHD гена на W хромозому означене са Seq3, која потиче од врсте бела кања (*Neophron percnopterus*), утврђена је дужина од 452 базна пара. Највећи степен преклапања (99,03%) и најнижа E вредност уочена је са врстом јастреб (*Accipiter gentilis*), код које је такође анализиран CHD ген и то W хромозом.

На основу анализе секвенце врсте крунасти ждрал (*Balearica regulorum*), која је означена као Seq4, потврђена је сличност са другом врстом истог рода *Balearica pavonina* и то 99,56%, као и са врстом црноглави ибис (*Threskiornis melanocephalus*) исто у проценту од 99,56%. За обе анализирани секвенце E вредност је била 0,0.

Анализом секвенце Seq5, која припада врсти плаво жута ара (*Ara ararauna*), утврђена дужина дела секвенце CHD гена на Z хромозому износила је 603 базна пара. Највећи степен подудараности уочен је са врстом *Ara militaris* (Е вредност износила је 0,0, а степен подудараности 95,54%) и са врстом *Aratinga acuticaudata* (Е вредност износила је 0,0, а степен подудараности 98,32%).

Анализирана секвенца означена као Seq6 потицала је од врсте молучански какаду (*Cacatua moluccensis*) и код ње је анализиран сегмент CHD гена на Z хромозому чија је дужина износила 641 базни пар. Код ове врсте пронађена су преклапања са следећим врстама *Ara militaris*, *Amazona ochrocephala* и *A. oratrix* и то у вредности 90,90%, 90,95% и 89,88%. За све три врсте Е вредност била је 0,0 и код све три врсте такође је анализиран CHD ген на Z хромозому.

За врсту белоћуби какаду (*Cacatua alba*) вршена је анализа дела секвенце CHD гена на Z и W хромозому. Анализом дела секвенце CHD гена на Z хромозому (означена као Seq7) од свих депонованих секвенци у бази највећи степен преклапања уочен је са врстом *Amazona ochrocephala* (90,10%), код које је такође вршена анализа CHD гена на Z хромозому. Укупна дужина анализираних секвенци је износила 604 базна пара. Анализом краће секвенце CHD гена на W хромозому (означен као Seq8) врсте белоћуби какаду највећи степен преклапања (93,98%) и најнижа Е вредност (0,0) уочена је са врстом *Ara militaris*, код које је такође анализиран CHD-W хромозом. Укупна дужина анализираних секвенци је износила је 383 базна пара.

Анализом секвенце која је означена као Seq9 црноглавог папагаја (*Pionites melanocephala*) укупна дужина анализираних CHD гена на Z хромозому износила је 645 базних парова. Највећи степен сличности ове врсте уочен је са врстом *Ara militaris* и *Amazona oratrix* и то 95,51% и 91,10%. Код обе врсте вршено је анализирање CHD гена на Z хромозому.

Секвенца означена као Seq10 потицала је од врсте риђа луња (*Milvus milvus*). На основу анализе дела CHD гена на W хромозому ове врсте показало се да је највећи степен сличности од 100% са црном луњом (*Milvus migrans*).

Укупна дужина базних парова износила је 453. Такође, висок степен сличности уочен је и са јастребом и то 99,27%.

Анализом дела секвенце CHD гена на W хромозому добијене од врсте *Amazona farinosa* (означена као Seq11) утврђен је највећи степен подударња (94,49%) и најнижа E вредност са врстом *Ara militaris*, код које је такође испитиван сегмент CHD гена на W хромозому.

Табела 13. Целокупне секвенце фрагмента CHD1 гена код девет различитих врста птица

Seq1	GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCA CAAATGGTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAATATCTGAAGTACCGT CAGTTTCCSTTTCAGGTAAGAATCCTGGGGGTAGCAGCCAAGAAGCTTT GATCTTGAATATAAGAAAAGTCTTTTCTTTGCTCTGAGGGTGACAGAAC ACTGGAACAAGTTGTCCAGAGGTTATAGTGGAATCTCCATCCTCTGCAA TGTTCAAAAGCCATCTGGACATGACCTTGGGCAACCTGCTTTAGCTGTC CCCTCTTGAATAGGGGAGTTAGACAAGATGTCCTCCAGAGGTCCCTTCC AACCTCAACTGTTTTGTGATTATGTGATCTTTACCACTTTGCTTAAGAAA AAATATGAGAAAATGTGTTCTTTTTCTAGAATGACTGGAATTGCTATAT CCTATATGGAATTCTGAAATGAAACAGGTGAATTA AAAAGTTATGTGA AGTGTTGCATTA C T A C T T T T C C T T C A C G T A A C A G T T T T G T C A G T T G A G A A T T A A A G T T G C T C T G A T T T T A A A C A T A G C A T A A G A A T G A T T T T T A A A C T G T A G T A T T C A A T C T C T T T A G A G A C T T G A T G G A T C A A T A A A G G G A G A A T T G A G G A A A C A A G C A C T G G A T C A T T T C A A T A A A C
Seq2	GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCT CTCAAATGGTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTA TCGACAGTTTCCSTTTCAGGTAAGAATTTTGCTGATAGTAACCAAGA AGTCTTGATCTTTACCACTTTATCTTAAGAAGAGTGTCCSTTTTTTGTA GAAAGATTTTGAAGTTTCATTTTATGTATAGGAAAAGACTAGCA ATTA C T A T A T G C T A A A T A G T A T T T T G A A A T T A A A C T G A T G A A T T A G A G A A A T T A A G T G T T A T A T T A C T C T T A T T C C C C T C C C C C A A T T G T T T T G G C A A T T G A G A A T T C A A G T T G C T C C A A T T G G A A T A T A G T A G G A G T T T C T T T T T A A C T G T A T T C A A T C T C T T T A G A G A C T T G A T G G A T C A A T A A A A G G G G A A T T G A G G A A A C A A G C A C T G G A T C A T T T C A A T
Seq3	GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCT CTCAGATGGTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATCTGAAGTA TCGTCAGTTTCCSTTTCAGGTAAGAACTTTGCTGGTAGTAGTTAAGA AGCCTTGATCTTTACCTCTTTAAGAAAAGTATCCTTTTTGTAGAAAG GTTTATGAAAGTTTAATTTTATGTACAGGAAAAGACTGGCAATTACT ATATGCTAAATACTATTTTGAATGAAACTGATGAATTAGAAAGAT GAAATGTTACATTA C T A C T T A T C C C C C C C A A T T G T T T T G G C A A T T G A

	GAATTCAAGTTGTTCCGATTAGAATATAGTAGGAGTTCCTTTTTAAC TGTATTATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGG AATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT
Seq4	GTTACTGATTTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTATTGATTTTCT CTCAAATGGTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTA TCGTCAGTTTCCCTTTCAGGTAAGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGA AGCCTTGATCTTTACCACTTTATCTTAAGAAAAGTGTCTTTTTGTAG AAAGATTTATGATTTAATTTTATGTACAGGAAAAGACTGGCAATTA CTATATGCTAAATAGTATTTTGAAATGAAACTGATGAATTAGAAAG ATGAAATGTTACATTACTCTTATTCCCTCCCCTGCAATTGTTTTGGTA ATTGAAAATTCAAGTTGCTCTTATTAGAATATAGTAGGAGTTCCTTT TTAACTGTATTATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAA GGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT
Seq5	GTTACTGATTTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCGATTTTCT CACAGATGGTGAGGATGCTGGACATCTTAGCAGAATATCTGAAGTA TCGTCAGTTTCCCTTTC AAGTAAGAATCTTGGTGTTAGTAGCCAAGA AGCTTTGATCTTGAATATTAGAAAATCTTTTCTTTATCTGAGGGTGA CAACTTCTTCAGAGGTTATGAGCTCTGTGACATTCAGAAGCCACCT GGACATGACACTGGGCAACCTGCTATTGCTGTCCCCAGTTAAGTTG GGGAGTTAGACAACATCACCTCCAGAGGTCCCTTCCAACCTAAATC TGTTTTGTGAATATGATCTGTATCACCTTGCTTAAGGGAAAGACACA AGAAAACATGTTCTTTTTCGATAAAAATCTGGCAATTGCTGTATGCTAA ATAATAATTTGATGTTAAATAGATAAATTA AAAAAGATACAAGAATT GATACATCACAGGTTTTCTTTTTTTCGTCACGTAACAGGTTTGGCATT TGAGAATTTGGGGTGCTCTGATTTAAAGGATAGTAAAAGAATTGCT TTTTAACTGTAGCGTTCAATCTCTTTAGAGGCTTGATGGATCAA
Seq6	GTTACTGATTTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTC AATTTTCT CACAGATGGTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAATATCTGAAGTA TCGTCAGTTTCCCTTTC AAGTAAGAATCTTGGTGGTAGTAGCCAAGA AGCTTTGATCTTGAATATTAGAAAATCTTCTCTTTATCTGAGGGTG ACAAGTTGTTTCAGAGGTTATGAACTCTGTGACATTCAGAAGCCACC TGGACATGACGCTGGGCAGCCTGCTTTTGCTGTCCCCACTTAAGTTG GGGAGTTAGACAATATCACCTCCAGAGGTCCCTTCCAACCTCAGCT GTTTTGTGAATATGATCTGTACCCTTTGCTTAAGAAAAGACACAA GAAAACACATTCTTTTTCGATAAAAATCTGGCAATTGCTATGTGCTAA ATAATAATTTGATGTTAAATAGATGAATTC AAAAAATAGAAGAATT GATGCATCACAGGTTTTCTTTTTTCTTTCACGTAACATGTTTGGCATT TGAGAATTTGGGGTGCTCTGATTTTGAATAGAGTATAAGAATTTT A

	ACTGTAGCATTCAATCTCTTTAGAGACTTGACGGATCAATAAAAAGG GGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTCAATA
Seq7	GTTACTGATTTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTAATTTTCT CACAGATGGTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAATATCTGAAGTA TCGTCAGTTTCCCTTTCAAGTAAGAATCTTGGTGGTAGTAGCCAAGA AGCTTTGATCTTGAATATTAGAAAAATCTTCTCTTTATCTGAGGGTG ACAAGTTGTTTCAGAGGTTATGAACTCTGTGACATTCAGAAGCTACC TGGACATGACGCTGGGCAGCCTGCTTTTGCTGTCCCCACTTAAGTTG GGGAGTTAGACAATATCACCTCCAGAGGTCCTTCCAACCTCAGCT GTTTTGTGAATATGATCTGTACCCTTTGCTTAAGAAAAGACACAA GAAAACACGTTCTTTTTTCGATAAAAATCTGGCAATTGCTATGTGCTAA ATAATAATTTGATGTTAAATAGATGAATTCAAAAAATAGAAGAATT GATGCATCACAGGTTTTCTTTTTTTCTTCACATAACATGTTTGGCATT TGAGAATTTGGGGTGCTCTGAAAAGGGTAGAGTATAAGAATTTTAA ACTGTAGCATTCAATCTCTTTAGAGACTTGACGGATCAATAAAAAG
Seq8	ACTGATTTTCTCTCAGATGGTGAGAATGCTAGACATCCTAGCGGAG TATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTTCAGGTAAGGATTTTGATGGT AGTAGCCAAGAAGCCTTGATCATTACCACTTTATCTTAAGAAAAGT GTCCTTTTTGTAGAAAGATTTATGAAAATTTTATTTTATGTACAGGA AAAGACTGACAATTACTATATGCTAAATAGTATTTTGAAACAAAAC TGATGAATTAGAAAGATTGTTACATTACTCTTATCCCCCCCCCCCCA TTGTTTCGGCAATTGAGATTTCAAATTGCTCCAATTAGAATATAGTA GGAGTTCCTTTTTAATTATGTTATTCAATATCTTTAGAGACTTGATGG ATCAATAAA
Seq9	GTTACTGATTTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCT CACAGATGGTGAGGATGCTGGACATCTTAGCAGAATATCTGAAGTA TCGTCAGTTTCCCTTTCAAGTAAGAATCTTGGTGTTAGTAGCCAAGA AGCTTTGATCTTGAATATTAGAAAAATCTTTTCTTTATCTGAGGGTGA CAACTTCTTCAGAGGTTATGAGCTCTGTGACACTCAGAAGCCACCT GGACATGACACTGGGCAACCTGCTATTGCTGTCCCCAGTTAAGTTG GAGAGTTAGACAATATCACCTCCAGAGGTCCTTCCAACCTAAAGC TGTTTTGTGAATATGATCTGTACCCTTTGCTTAAGGGAAAGACACA AGAAAACGTGTTCTTTTTTCGATAAAAATCTGGCAATTGCTGTATGCTAA ATAATAATTTGATGTTAAATAGATAAATTAAAAAAATACAAGAATT GATACATCACAGGTTTTCTTTTTTTTCGTCACATAACAGGTTTGGCATT TGAAAATTTGGGGTGCTCTGATTTTGAATATAGTAAAAGAATTGCTT TTAACTGTAGCGTTCAATCTCTTTAGAGGCTTGATGGATCAATAAA AGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTCAATA

Seq10	<p>GTTACTGATTTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCT CTCAGATGGTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATCTGAAGTA TCGTCAGTTTCCCTTTCAGGTAAGAACTTTGCTGGTAGTAGTAAAGA AGCCTTGATCTTTACCTCTTTAAGAAAAGCGTCCTTTTGGTAGAAAA GTTTATGAAAGTTTAATTTTATGTACAGGAAAAGACTGGCAATTACT ATATGCTAAATACTATTTTGAATGAAACTGATTAATTAGAAAGAT GAAATGTTACACTTCTTATCCCCCCCCCAATTGTTTTGGCAATTG AGAATTCAAGTTGTTCCGATTAGAATATAGTAGGAGTTCCTTTTTAA CTGTATTATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGG AATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTC AAT</p>
Seq11	<p>ACTGATTTTCTCTCAGATGGTGAGAATGCTAGACATCCTAGCGGAG TATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGTAAGAATTTTGCTGATA GTAGCCAAGAAGCCTTGATCATTACCACTTTATCTTAAGAAAAGTG TCCTTTTTGAAGACAGATTTATGAAAATTTTATTTTATGTACAGGAA AAGACTGGCAATTATTATATGCTAAATAGTATTTTGAACAAAACCT GATGAAATAGAAAGATTGTTACACTTCTTATCCCCCCCCCCCATT GTTTTGGCAATTGAGATTTCAAGTTGCTCCAATTAGAATATAGTAGG AGTTCCTTTTTAATTATGTTATTCAATATCTTTAGAGACTTGATGGAT CAATAAA</p>

Табела 14. Приступни бројеви добијени за секвенце депоноване у NCBI генску базу података

Ознака секвенце	Приступни број	
Seq1	<i>BankIt2506138 Seq1</i>	OK376755
Seq2	<i>BankIt2506138 Seq2</i>	OK376756
Seq3	<i>BankIt2506138 Seq3</i>	OK376757
Seq4	<i>BankIt2506138 Seq4</i>	OK376758
Seq5	<i>BankIt2506138 Seq5</i>	OK376759
Seq6	<i>BankIt2506138 Seq6</i>	OK376760
Seq7	<i>BankIt2506138 Seq7</i>	OK376761
Seq8	<i>BankIt2506138 Seq8</i>	OK376762
Seq9	<i>BankIt2506138 Seq9</i>	OK376763
Seq10	<i>BankIt2506138 Seq10</i>	OK376764
Seq11	<i>BankIt2506138 Seq11</i>	OK376765

Табела 15. Табеларни приказ врста птица код којих је вршено секвенцирање и аутор који је први описао врсту

Sequence_ID	Organism
Seq1	<i>Bucorvus leadbeateri</i> (Vigors, Nicholas Aylward)
Seq2	<i>Bucorvus leadbeateri</i> (Vigors, Nicholas Aylward)
Seq3	<i>Neophron percnopterus</i> (Linnaeus, Carl)
Seq4	<i>Balearica regulorum</i> (Bennett, Edward Turner)
Seq5	<i>Ara ararauna</i> (Linnaeus, Carl)
Seq6	<i>Cacatua moluccensis</i> (Gmelin, Johann Friedrich)
Seq7	<i>Cacatua alba</i> (Müller, Philipp Ludwig Stadius)
Seq8	<i>Cacatua alba</i> (Müller, Philipp Ludwig Stadius)
Seq9	<i>Pionites melanocephala</i> (Linnaeus, Carl)
Seq10	<i>Milvus milvus</i> (Linnaeus, Carl)
Seq11	<i>Amazona farinosa</i> (Boddaert, Pieter)

5.4. Резултати дизајнирања новог сета прајмера

На основу резултата секвенцирања узорка пореклом од белоћубог какадуа (*Cacatua alba*), коришћењем *online* програма NCBI, дизајнирани су и предложени прајмери приказани у Табели 16.

Табела 16. Предложени прајмери за врсту *Cacatua alba*

Назив прајмера	Секвенца
F_all_first	TACGAGAACGTGGCAACAGA
R_all	TCCAGTGCTTGTTTCCTCAA

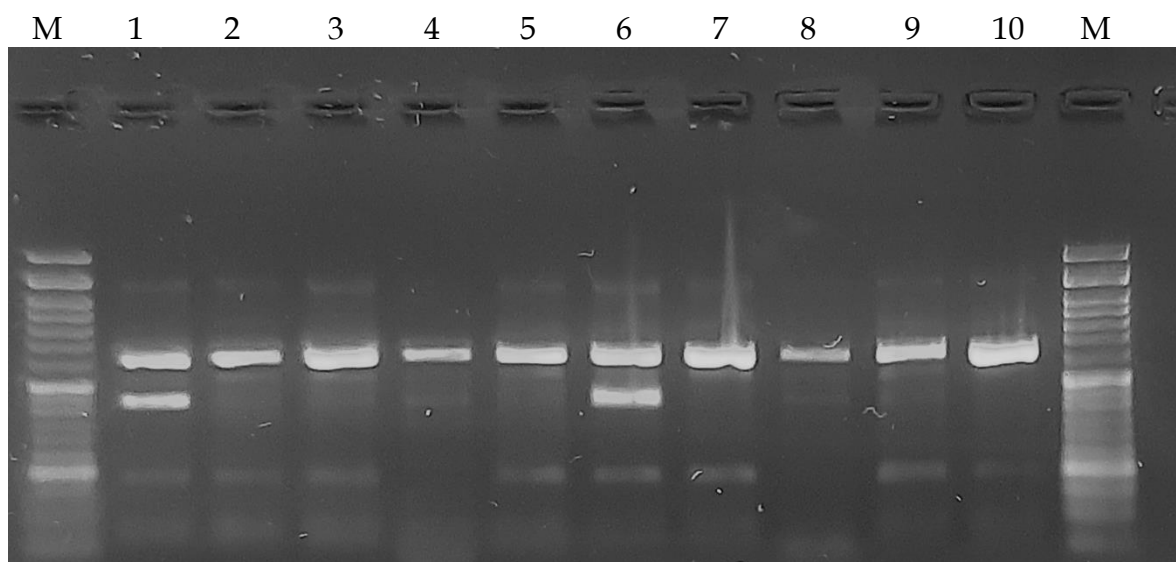
Коришћењем апарата MultiGeneGradient Thermal Cycler (Labnet International Inc., USA) и анализирањем добијених резултата показало се да најбоља температура хибридизације, уколико се користе прајмери F_all_first и F_all_second, износи 48 °C. За тестирање ефикасности прајмера коришћено је десет узорака пореклом од различитих јединки, врсте *Cacatua alba*. За врсту *Cacatua alba* коришћен је протокол за изолацију, као што је претходно описано. Амплификација свих тестираних узорака била је успешна коришћењем протокола који је приказан у Табели 17.

Табела 17. Температурни протокол за PCR реакцију

1. Почетна денатурација	95 °C	3 минута
2. Денатурација	95 °C	15 секунди*
3. Хибридизација	52 °C	15 секунди*
4. ДНК екстензија	72 °C	15 секунди*
5. Финална екстензија	72 °C	8 минута

*Кораци два, три и четири поновљени су 39 пута (укупно 40 циклуса).

Сви производи амплификације визуелизовани су хоризонталном електрофорезом на агарозном гелу (Слика 4) у циљу потврде присуства РСР продукта.



Слика 4. Резултати хоризонталне електрофорезе испитиваних узорака пореклом од врсте *Sacatia alba* коришћењем F_all_first и R_all пара прајмера М- маркер; Узорци: 1 и 6 - женке; 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 - мужјаци

6. ДИСКУСИЈА

Због боље прегледности дискусија је подељена на потпоглавља према постављеном циљу и задацима истраживања. Добијени резултати су упоређени међусобно, као и са доступном литературом из области истраживања.

6.1. Одређивање врсте птица

Илегална трговина представља глобални проблем и шири се из сиромашних земаља у богате (Jan и Fumagalli, 2004; Alves и сар., 2013; TRAFFIC, 2020). Сматра се да се животиње превозе и транспортују истим рутама које се користе за трговину људима, наркотицима и оружјем (Cook и сар., 2002; Warchol и сар, 2003). Процењује се да годишња добит од ове недозвољене активности достиже 2,3 милиона евра само у ЕУ, а до 23 милијарде у САД (Channing, 2017; TRAFFIC, 2020). Претерано изловљавање, уништавање станишта, хватање и илегална трговина животињама довели су до озбиљних проблема и све већег притиска на угрожене и заштићене врсте (Alacs и сар., 2010). Све ове илегалне радње представљају велику претњу за опстанак врста и у великој мери утичу на биодиверзитет (Warchol, 2004).

Анализа ДНК данас представља неизоставно оруђе у свим испитивањима који се баве екологијом, менаџментом, форензичким испитивањима и очувањем дивљих животиња. Услед повећаног броја генетичких маркера, ове анализе постале су доступне и врло корисне у свим случајевима које подразумевају илегалне и незаконите радње из ове области.

Када су у питању истраживања из области дивљих животиња, молекуларне анализе су од великог значаја (Davitkov и сар., 2017), јер се

генетички подаци могу користити за процену система парења, хибридизације, протока гена, ефикасне величине и одрживости популације. Генетички подаци се такође могу користити за индивидуалну идентификацију, одређивање пола и врсте, стицање увида у демографске обрасце повезане са смањењем и ширењем популације. Сви ови фактори су или повезани са екологијом врсте или пружају важне информације за управљање и конзервацију угрожених животињских врста (DeYoung и Honeycutt, 2005). За одређивање пола и врсте користе се различите молекуларне технике, међутим, већина се односи на идентификацију врста сисара или протозоа (Davitkov и сар., 2015; Farag и сар., 2015; Davitkov и сар., 2017; Perktas и сар., 2020), док је до почетка овог истраживања за идентификацију врста птица постојало само једно истраживање које се односи на употребу капиларне електрофорезе за идентификацију врсте птица (Lee и сар., 2010).

Генетичке методе као и већина техника имају своје предности и ограничења. Уколико се користе на адекватан начин могу пружити велики број корисних информација у различитим ситуацијама. Попут радиотелеметрије, генетичке методе могу бити једино средство за стицање поузданих података неопходних за решавање кључних питања или за тестирање хипотеза, посебно у околностима у којима су традиционални приступи неадекватни. У многим случајевима, међутим, генетички подаци ће бити највреднији у комбинацији са другим информацијама, нпр. бихејвиоралним, демографским, просторним, итд. (DeYoung и Honeycutt, 2005).

Један од приступа проучавању образаца ширења и имиграција је коришћење података добијених употребом генетичких маркера који се наслеђују од једног родитеља (маркера на матернално наследној митохондријској ДНК или маркера на патернално наследном Y-хромозому). Подаци добијени путем ових полно везаних маркера могу се користити одвојено или у комбинацији са маркерима који се наслеђују од оба родитеља. На пример, Scribner и сар. (2001) користили су комбинацију маркера са

митохондријске ДНК (мтДНК) и микросателитских маркера нуклеарне ДНК, укључујући оне везане за пол.

У овом истраживању испитиване су врсте које су заштићене националним или интернационалним законима или правилницима и које су најчешће мете илегалне трговине (Правилник о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива; <https://www.cites.org>).

За амплификацију CHD гена, уместо 2550F/2718R коришћеног до сада (Bosnjak и сар., 2013, Stevanov-Pavlovic и сар., 2013), коришћен је сет прајмера CHD1F/CHD1R, јер овај сет прајмера даје фрагменте мањих димензија који су адекватни за капиларну електрофорезу (Lee и сар., 2010). Такође, овај сет прајмера је, у поређењу са 2550F/2718R, бољи за мање и деградиране узорке, који се често користе за детерминацију пола птица (Lee и сар., 2010). Према резултатима Lee и сар. (2010), величина CHD-Z и CHD-W ампликона може бити врло слична код врста из истог реда или фамилије. Ови наводи су потврђени и у овој докторској дисертацији. За 35 врста у овом раду величина CHD-Z и CHD-W ампликона је по први пут одређена (Davitkov и сар., 2021).

Резултати су били доследни у погледу једнакости величине CHD-Z ампликона у узорцима пореклом од исте врсте птица, изузев код врста *Buteo buteo* и *Cygnus cygnus*. Ово се може објаснити генетском варијабилношћу која може обухватити до три базна пара унутар узорака исте врсте (Lee и сар., 2010). Велики број фактора може утицати на генетску варијабилност врста. Важно је схватити да историјски фактори, попут промене демографије и појава или нестанка препрека за генски проток, могу имати велики утицај на тренутне обрасце генетске разноликости и сличности, како унутар исте врсте, тако и између различитих врста (Nelson и сар., 2000). На пример, Zink (1997) је описао неколико различитих образаца генетичке и географске варијабилности код северноамеричких птица. Популације неколико врста које су распрострањене широм Северне Америке, нпр. канадска гуска (*Branta canadensis*), врабац лисица (*Passerella iliaca*), показале су велике генетичке разлике тамо где нису постојале

очигледне баријере за проток гена. Вероватно су популације ове две врсте раздвојене још током плеистоцена, али су популације опет дошле у контакт како су се шириле током текућег интергласијалног периода. Супротно томе, неке врсте чија данашња географска дистрибуција обухвата велике делове Северне Америке и који показују велику количину фенотипских варијација су генетски врло сличне (нпр. црвенокрили кос (*Agelaius phoeniceus*) и певајући врапци (*Melospiza melodia*)). У другим случајевима, продужено одвајање популација довело је до стварања подврста које су се мењале због антропогених утицаја (Mank и сар., 2004).

У овом истраживању, дванаест узорака је потицало од врста птица које су претходно анализирали Lee и сар. (2010). Десет од њих (бр. 1-4, 7, 8, 10, 11, 15 и 16), произвели су ампликоне исте дужине (како CHD-Z, тако и CHD-W), као у истраживању Lee и сар. (2010). Овај резултат потврђује способност капиларне електрофорезе да истовремено одређује пол и врсту птица. Два узорка пореклом од врсте *Falco tinnunculus* произвела су веће CHD-Z ампликоне (526 bp) од претходно објављених (522 bp) од стране Lee и сар. (2010). Међутим, Lee и сар. (2010) анализирали су само једног мужјака *Falco tinnunculus*. Само један мужјак у раду Lee и сар. (2010) и једна женка у овом раду нису довољни за процену варијабилности дужине CHD-Z ампликона. Код неких врста испитиваних у овом раду (*Buteo buteo*, *Falco tinnunculus*, *Cygnus cygnus*) такође је уочена разлика у величини CHD-Z ампликона у различитим узорцима исте врсте. Ови резултати потврђују да варијабилност дужине CHD-Z алела може бити присутна унутар врста (Lee и сар., 2010) и требало би је испитати на већем броју узорака исте врсте. Уз већи број узорака, треба испитати и мушке и женске јединке, јер је понекад фрагмент CHD-W још адекватнији маркер за одређивање врсте. То поткрепљују наши резултати анализираних врста из рода *Amazona* који су детектовали CHD-Z ампликоне исте величине у више врста (узорци *Amazona aestiva* и *A. ochrocephala*; и узорци *A. finschi*, *A. albigena* и *A. albifrons*), али је у свим случајевима величина CHD-W ампликона била различита (Davitkov и сар., 2021).

Код врста *Ara chloroptera* и *A. macao* (Psittaciformes) величина фрагмента CHD-Z имала је једнаку дужину (521 bp) и стога се не може користити за разликовање врста када се анализирају само мужјаци. Одсуство специфичне дужине секвенци CHD гена може бити резултат постојања више од 300 врста у реду Psittaciformes, што значи да је готово немогуће да свака врста има јединствену величину фрагмента CHD-Z. Такав проблем се не односи на женке због варијабилности фрагмента CHD-W, тако да се врсте могу лако одредити, чиме се укупна варијабилност у оквиру врсте значајно повећава (узорци бр. 38 и 39).

Верујемо да је за форензичку примену пробабилистички приступ једино могуће решење за идентификацију врста помоћу капиларне електрофорезе. Морају се укључити вероватноћа испадања фрагмената, као и укључивање фреквенција дужине фрагмената код врста код којих се примећује више од једне дужине фрагмента. С друге стране, дискриминација између врста чији се фрагменти разликују само по једном базном пару је такође упитна, јер исти PCR производ може толико варирати чак и између две узастопне реакције (Rahim и сар., 2012).

Поред свих наведених фактора који могу утицати на резултате генетичких испитивања не треба занемарити ни чињеницу да фактори средине имају значајан утицај. Загађивачи животне средине су потенцијални извор мутација соматских и ембрионалних ћелија што може допринети укупном генетском оптерећењу популације одређене врсте (Stanimirovic и сар., 1995, 1997, 1998; Bickham и сар., 2000). Генетичке анализе врста дивљих животиња које су изложене штетном загађењу пружају средство за процену у којој мери поједине класе контаминената животне средине узрокују промене на нивоу гена (Bickham и Smolen, 1994). У студијама које су спроведене на сеоскојласти (*Hirundo rustica*), анализом микросателита уочена је повећана стопа мутације код популација које су изложене радиоактивним загађивачима (Ellegren и сар., 1997). Изложеност радиоактивној контаминацији мења генетску структуру популације кроз селекцију за толерантне генотипове.

Одређен степен хибридизације или укрштање сличних врста или подврста и преклапања у одређеним сегментима генетичког кода могу настати када се њихови географски ареали преклапају. Савремени случајеви хибридизације често се приписују променама у распрострањености врста, услед уклањања неке баријере која је ограничавала ширење врсте или уколико је дошло до уплива домаћих врста које су уско повезане са дивљином. Mank и сар. (2004) открили су да се стопа хибридизације између америчких црних патака (*Anas rubripes*) и дивље патке (*A. platyrhynchos*) повећала током прошлог века, како су се популације дивљих патки шириле у распон црне патке.

Од великог је значаја напоменути и да мутације, које мењају ДНК секвенце, а преносе се на потомство, представљају највећи извор генетичких варијација (Nei и Kumar, 2000). Мутације се могу јавити у различитим формама, од промене на нивоу једног нуклеотида, па до промена на нивоу гена, хромозома или чак више хромозома (DeYoung и Honeycutt, 2005). Управо овакве промене могу се манифестовати разликом у величини фрагмената, посебно код врста које су филогенетски блиске.

6.2. Детерминација пола птица

Идентификација пола различитих врста сисара и птица је врло важна и користи се у различите сврхе, од форензике и спровођења закона, до управљања популацијом и у истраживачке сврхе (Cassidi и Gonzales, 2005). Анализе које се односе на одређивања пола животиња представљају значајан део бројних испитивања (Morinha и сар., 2012). Две најбитније примене одређивања пола птица јесу проучавање односа полова унутар популација, као и примена у свим програмима који имају за циљ заштиту врста које су угрожене (Griffiths и сар., 1996). Такође, детерминација пола је од великог значаја и при популационим проучавањима, проучавањима понашања, процени начина формирања парова, управљањем врста птица које живе у

дивљини, употреби при гајењу живине, филогенетским студијама и у форензичке сврхе (Lens и сар., 1998; Whittingham и Dunn, 2000; Mine и сар., 2002; Batellier и сар., 2004; He и сар., 2005; An и сар., 2007; Bosé и сар., 2007; Genovart и сар., 2008; Freed и сар., 2009; Zhao и сар., 2009; Bush и сар., 2011; Jensen и сар., 2011; Suh и сар., 2011).

Детерминација пола је од великог значаја и у свим ситуацијама када је потребно унапред направити парове код младунаца код којих није познат пол (не постоји полни диморфизам (Vucicevic и сар., 2012; Vucicevic и сар., 2013). Када су у питању заштићене врсте, пол се одређује и у свим ситуацијама када се планира вештачко осемењавање.

Када је у питању употреба ових метода у форензици, од велике је важности знати пол птица, јер врло често током илегалне трговине кријумчари тргују полом који је више тражен. Често то буду мужјаци због лепоте перја и песме, а женке због репродукције. Пре употребе молекуларно-генетичких метода, било је тешко, у неким случајевима и немогуће, одредити пол многих врста птица, само на основу морфологије (Griffiths и сар., 1998). Данас се одређивање пола обавља захваљујући полиморфним полно-специфичним маркерима, који су присутни на оба полна хромозома. Маркери који се налазе само на једном полном хромозому (Y код сисара, односно W код птица), непоуздани су (и одбачени) јер се не зна када је неуспео PCR, а када заиста није присутан Y, односно W хромозом у узорку.

Данас се сматра да је више од 50% врста птица мономорфно, што значи да се мужјаци и женке не могу разликовати по спољашњем изгледу. Такође, код диморфних птица врло често се јасна разлика у спољашњем изгледу може уочити тек након достизања полне зрелости. Младунци ових птица не могу се разликовати по излегању, односно потребно је доста времена да се диморфност ових птица испољи (Griffiths и Tiwari, 1995; Griffiths и сар., 1998). Данас постоји велики број метода које се користе за одређивање пола код животиња, али методе које укључују анализе делова секвенци ДНК су брже, прецизније и за њихову употребу могу се користити и стари и деградирани узорци, па самим

тим и узорковање материјала није инвазивно и не представља стрес за животињу (Cerit и Avanus, 2007).

Сматра се да полно специфичан CHD ген данас има највећи потенцијал када је у питања одређивање пола птица. Због постојања разлике у величини између интронских секвенци унутар фрагмената на Z и W хромозому (названих CHD-Z и CHD-W у овом раду), омогућено је одређивање пола код многих врста птица молекуларним техникама способним да одвоје фрагменте који се разликују у врло малом броју базних парова (чак и само једном у неким случајевима). Када је реч о одређивању пола код узоркованих птица применом сета прајмера обележених бојом CHD1F/CHD1R, капиларна електрофореза се показала као тачна, брза и поуздана метода. Наши резултати су потврдили да је наведена метода омогућила тачно одређивање пола код свих испитиваних врста, иако је PCR са визуелизацијом на хоризонталној електрофорези такође био изузетно успешан, као што је приказано у овој дисертацији, али и у претходним студијама (Lee и сар., 2010; De Andrade Silva и сар., 2011; Vucicevic и сар., 2013; Stevanov-Pavlovic и сар., 2013; Khan и сар., 2019).

Студија Griffiths и сар. (1998) показала је да су два прајмера 2550F/2718R комплементарна местима на конзервисаним егзонским регионима, али ампликон обухвата и интронски регион и то и на CHD-Z и на CHD-W. С обзиром да су ови интрони некодирајући и последично мање конзервисани, њихове дужине се обично разликују између различитих врста, па чак и унутар врста, што се одражава у разлици у дужини CHD ампликона између различитих врста.

У свим случајевима обрађеним у овом истраживању, пол одређен хоризонталном електрофорезом на агарозном гелу потврђен је капиларном електрофорезом. На агарозном гелу, код узорака хетерозиготних женских јединки могли су се визуелизовати амплификовани производи две различите величине, док код хомозиготних мужјака могли су се визуелизовати амплификовани производи исте величине. Изузетак су узорци од јединки из рода *Strigiformes* где је примећена само једна трака, без обзира на пол.

Очекивано је да ће разлика у величини CHD-Z и CHD-W ампликона код филогенетски блиских врста бити 30-50 bp, али може бити у распону од 10 до 80 bp (Vucicevic и сар., 2013). Код тих врста је тешко утврдити пол гел електрофорезом након PCR амплификације, јер се женске јединке често могу погрешно протумачити као мужјаци (Vucicevic и сар., 2013; Çakmak и сар., 2017). Наши резултати потврђују да капиларна електрофореза превазилази недостатак гел електрофорезе у одређивању пола код врста птица као што су сове. Такође, уз прецизну детерминацију пола, капиларна електрофореза симултано омогућава и одређивање врсте и подврсте птице (Lee и сар., 2010).

Такође, улога капиларне електрофорезе у детерминацији пола је од великог значаја код птица певачица, као што су врсте из реда Passeriformes, а фамилије Fringillidae. За разлику од претходно испитиваних птица у овом истраживању (као што су папагаји, сове и птице грабљивице), код којих је дужина CHD-Z фрагмента већа, а дужина CHD-W мања, код птица певачица је обрнута ситуација, односно дужина CHD-W фрагмента је већа, а дужина CHD-Z је мања. Такође, за разлику од осталих врста птица где је величина између базних парова била већа од 50, код ових птица разлика је врло мала, па је самим тим и јако тешко разликовати мужјаке од женки хоризонталном електрофорезом на агарозном гелу. За разлику од те електрофорезе, којом је било тешко утврдити да ли је у питању мушка или женска јединка, капиларна електрофореза је обезбедила несумњиве и поуздане резултате.

6.3. Интерпретација резултата добијених секвенцирањем пурификованих ампликона

Анализа ДНК у циљу препознавања и идентификације познатих и непознатих врста сисара и птица је и даље изазов за научнике. Постоји велики број предложених метода које се користе у ове сврхе, као што је коришћење капиларне електрофорезе (Lee и сар., 2010), ДНК баркодови (Herbert и сар.,

2004), секвенцирање и многе друге. Директно секвенцирање раније је било технички захтеван поступак. Међутим, развој молекуларних техника које омогућавају брзу амплификацију фрагмената ДНК (путем PCR) из малих количина ДНК и аутоматизовано секвенцирање тих фрагмената повећало је ефикасност генетичких студија у погледу времена и трошкова. Последице, анализе ДНК секвенци код дивљих животиња постају све чешће, укључујући и анализу варијација неутралних секвенци. На пример, анализом ових секвенци утврђено је да је варијација боје перја унутар исте врсте птица повезана са полиморфизмом гена за рецептор за меланокортин 1 (Doucet и сар., 2004; Mundy и сар., 2004).

Директно секвенцирање фрагмената ДНК обезбеђује најтачнију процену генетске варијације на нивоу нуклеотидне секвенце, јер се може визуелизовати промена сваког нуклеотида. Са аналитичког становишта, разне методе процене нивоа варијација и обрасци различитости су добро утврђени управо захваљујући анализи нуклеотидних секвенци (Nei и Kumar, 2000). Као што је раније наглашено, методом секвенцирања може да се прочита сваки нуклеотид у циљаном сегменту ДНК. Захваљујући овоме, могуће је уочити и најмање генетичке промене у испитиваном узорку.

Као што је раније напоменуто, велики број фактора утиче на промене на нивоу ДНК. Мутације могу бити различитих размера, у распону од промена у појединачним нуклеотидима (SNP), до инсерција и делеција нуклеотида, делова гена, целих гена, делова хромозома, целих хромозома или чак и више хромозома (Hedrick, 2000). Мутације могу бити узроковане различитим факторима, укључујући грешке у репликацији ДНК, физичко оштећење хромозома, непотпуно раздвајање током мејозе, као и деловање одређених хемикалија и зрачења (нпр. УВ зрачења). Утицај физичких фактора на степен промена зависи од тога на ком месту се мутација јавља и који је обим и врста мутације. Мутације које се јављају у генима могу утицати на фенотип, посебно ако мутација мења структуру или функцију генских производа (протеина, ензима итд.). Међутим, већина мутација које укључују замене нуклеотида су

неутралне и немају видљив ефекат на фенотип (Nei и Kumar, 2000). Стопе мутације могу се драматично разликовати од места нуклеотида, генетских локуса и дела секвенце ДНК (Nei и Kumar 2000). Групе понављајућих ДНК секвенци, где се комбинације нуклеотида понављају много пута, су такође склоније високим стопама мутације због грешке у репликацији (Eisen, 1999). Статистика каже да је стопа мутације мтДНК 5–10 пута већа него у нуклеарној ДНК. Ова повишена стопа мутација објашњава се следећим факторима: исправљање грешака и поправљање ДНК је мање ефикасно у мтДНК, него у нуклеарној ДНК, мтДНК није чврсто везана и заштићена протеинима (као што је нуклеарна ДНК) и унутар ћелијских линија постоји више репликација мтДНК него нуклеарне ДНК (Avisе, 2000).

Због свих наведених разлога који могу довести до промена на нивоу ДНК, методе секвенцирања су за сада опште прихваћене када су у питању истраживања која се односе на добијање информација о сродству, променама на нивоу ДНК, сличности и различитости између врста. У овом раду обављено је секвенцирање 11 пречишћених PCR продуката амплификованог CHD региона различитих врста птица. Добијене секвенце су унете у *online* генску базу NCBI и анализирани. Добијени резултати се у највећем броју случајева поклапају са подацима добијеним из *online* генске базе (NCBI). За све продукте, као што је препоручено, коришћени су фрагментни ДНК који су били приближне величине од око 500 базних парова. За поједине узорке величина је била већа од 500 базних парова.

Највећи степен преклапања уочен је код врста крунастог ждрала (*Belearica pavonina*) и рибе луње (*Milvus milvus*). Након поравнавања, секвенца пореклом од крунастог ждрала се скоро у потпуности преклопила са секвенцама крунастог ждрала које су већ биле присутне у *online* генској бази NCBI (99,56% сличности). Код врсте риба луња, уочен је највећи степен преклапања са црном луњом која припада истом роду. Овакав степен подударности између јединки различите врсте које припадају истој фамилији, или чак истом роду је

очекиван. Наравно, подударање не мора бити 100% да би били сигурни која животињска врста је у питању.

Највећи степен сличности врста плаво-жута ара показала је управо са врстом из исте фамилије и то са зеленом аром (95,54%), као и са врстом *Aratinga acutivaudata*. У случају врсте *Cacatua alba* и *Cacatua moluccensis*, највећи степен преклапања уочен је са зеленом аром (*Ara militaris*), која припада истом реду (Psitaciformes).

Црноглави папагај је такође показао сличност папагајима, само са другим врстама (*Amazona oratrix*). Анализом секвенце добијене од папагаја *Amazona farinosa* утврђен је највећи степен сличности са врстом *Ara militaris*. Када су у питању резултати добијени код папагаја, они су и очекивани, због великог броја и сличност врста из овог реда. Међутим, услед интраспецијске варијације не може се очекивати да преклапање увек буде 100%. Код врста које су таксономски блиске преклапања између 90 и 95% су довољна, посебно уколико се анализира секвенца довољне дужине (Ogden и сар., 2009).

Осим папагаја и друге врсте птица показале су одређен степен сличности када су се добијене секвенце упоређивале са доступним секвенцама у NCBI бази. Тако је бела кања показала највећу сличност са јастребом и сурим орлом. Различити су разлози због којих постоје сличности и подударања секвенци врста које настањују слична станишта, који се на исти начин хране или им се ареали преклапају.

Недавне ДНК студије које су вршене на врстама из фамилије Falconidae, показале су да птице из ове фамилије нису блиско повезане са врстама из фамилије Accipitridae, као што је сматрано (Liu и сар., 2017). Извршеним анализама уочен је велики степен сличности са врстама које припадају папагајима и птицама певачицама. Ова чињеница указује на потребу за даљим испитивањем сродничких односа међу птицама, као и на неизоставну улогу ДНК анализа у циљу добијању података који су неопходни за формирање филогенетског стабла птица. Такође, неизоставну улогу коришћења метода

секвенцирања, јер се само на тај начин могу добити потпуније информације о врстама.

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата у овој докторској дисертацији, као и поређењем са подацима из доступне литературе, изведени су следећи закључци:

1. Молекуларно-генетичке анализе CHD гена код птица се са успехом могу применити у одређивању њихове врсте и пола.,

2. Метода капиларне електрофорезе се показала као поуздана у одређивању пола код птица у свим случајевима када резултати хоризонталне електрофорезе нису били поуздани.

3. Метода капиларне електрофорезе се са успехом може применити за одређивање врсте птица, због чега има велики потенцијал за примену у ветеринарској форензици.

4. За 35 врста птица у овом раду величина CHD-Z и CHD-W ампликона је по први пут одређена, па се ове вредности могу користити као полазни стандарди за друга истраживања.

5. Једанаест добијених секвенци пореклом од девет врста птица депонованих у генску базу NCBI од великог су значаја за боље дефинисање сродничких односа између врста, форензичке анализе, истраживања биодиверзитета и очување врста птица.

6. Креиран сет прајмера F_all_first и R_all, који се показао примењив код свих тестираних врста какадуа, отвара могућност даљег испитивања и дизајнирања прајмера за велики број угрожених и заштићених врста птица.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed, A. (2004). Illegal Bird Trade, In: Islam, M. Z. and Rahmani, A. R. *Important Bird Areas in India: Priority sites for conservation*. Indian Bird Conservation Network: Bombay Natural History Society and BirdLife International (UK), 66-70.
2. Ahmed, A. (2010). Imperilled-custodians-of-the-night: A study on illegal trade, trapping and utilization of owls in India. TRAFFIC India, WWF India. New Delhi, India.
3. Alacs, E.A., Georges, A., Fitzsimmons, N. N., Robertson, J. (2010). DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*. 6(3):180-194.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff M., Roberts, K., Walter, P. (2002). Manipulating proteins, DNA, and RNA, In: *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition, Garland Science, New York, 508-509.
5. Alves, R.R., Lima, J.R., Araujo, H.F. (2013). The live bird trade in Brazil and its conservation implications: an overview. *Bird Conservation International*. 23(1):53-65.
6. An, J., Lee, M., Min, M., Lee, M., Lee, H. (2007). A molecular genetic approach for species identification of mammals and sex determination of birds in a forensic case of poaching from South Korea. *Forensic Science International*. 167:59-61.
7. Archawaranon, M. (2002). Zoogeography of various hill mynah phenotypes in Thailand. *Journal of Biological Sciences*. 2:645-647.
8. Archawaranon, M. (2004) Rapid sexing hill mynah *Gracula religiosa* by sex chromosomes. *Biotechnology*. 3: 160-164.58.
9. Bantock, T. M., Prys-Jones, R. P., Lee P. L. (2008). New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens. *Molecular Ecology Resources*. 8:519-28.

10. Batellier, F., Marchal, F., Scheller, M. F., Gautron, J., Sellier, N., Taouis, M., Monbrun, C., Vignal, A., Brillard, J. P. (2004). Sex ratios in mule duck embryos at various stages of incubation. *Theriogenology*. 61:573– 580.
11. Bercovitz, A. B., Czekala, N. M., Lasley, B. L. (1978). A new method of sex determination in monomorphic birds. *The Journal of Zoo Animal Medicine*. 9 (4):114-124.
12. Biała, A., Dybus, A., Pawlina, E., Proskura, W. (2015). Genetic diversity in eight pure breeds and urban form of domestic pigeon (*Columba livia* var. domestica) based on seven microsatellite loci. *Journal of Animal and Plant Sciences*. Sci. 25:1741-1745
13. Bickham, J. W., Sandhu, S., Hebert, P. D., Chikhi, L., Athwal, R. (2000). Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 463(1):33-51.
14. Bickham, J. W., Smolen, M. J. (1994). Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environmental Health Perspectives*. 102:25–28.
15. Bosé, M., Le Gouar, P., Arthur, C., Lambourdière, J., Choisy, J. P., Henriquet, S., Lecuyer, P., Richard, M., Tessier, C., Sarrazin, F. (2007). Does sex matter in reintroduction of griffon vultures (*Gyps fulvus*)? *Oryx*. 41,503– 8.
16. Bosnjak, J., Stevanov-Pavlovic, M., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Simeunovic, P., Resanovic, R., Stanimirovic, Z. (2013). Feasibility of noninvasive molecular method for sexing of parrots. *Pakistan Journal of Zoology*. 45:715-720.
17. Botelho, J. F., Ossa-Fuentes, L., Soto-Acuña, S., Smith-Paredes, D., Nuñez-León, D., Salinas-Saavedra, M., Ruiz-Flores, M., Vargas, A. O. (2014). New developmental evidence clarifies the evolution of wrist bones in the dinosaur–bird transition. *PLoS Biology*. 12(9):e1001957.
18. Branicki, W., Kupiec, T., Pawlowski, R. (2003). Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *Journal of Forensic Science*. 48(1):1-5.

19. Brzoska, P.M., Chen, H., Levin, N.A., Kuo, W.L., Collins, C., Fu, K.K., Gray, J.W., Christman, M.F. (1996). Cloning, mapping, and in vivo localization of a human member of the PKCI-1 protein family (PRKCNH1). *Genomics*. 36:151-156.
20. Bush, K. L., Dyte, C. K., Moynahan, B. J., Aldridge, C. L., Sauls, H. S., Battazzo, A. M., Walker, B. L., Doherty, K. E., Tack, J., Carlson, J. (2011). Population structure and genetic diversity of greater sage-grouse (*Centrocercus urophasianus*) in fragmented landscapes at the northern edge of their range. *Conservation Genetics*. 12: 527- 42.
21. Çakmak, E., Akın Pekşen, Ç., Bilgin, C. C. (2017). Comparison of three different primer sets for sexing birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 29, 59-63.
22. Carrete, M., Tella, J. (2008). Wild- bird trade and exotic invasions: a new link of conservation concern? *Frontiers in Ecology and the Environment*. 6(4):207-211.
23. Cassidy, B. G., GonZales, R. A. (2005). DNA testing in animal forensics. *Journal of Wildlife Management*. 69:1454-1462.
24. Ciampolini, R., Cecchi, F., Bramante, A., Tancredi, M. and Presciuttini, S. (2012). Towards standardization of canine STRs: a proposed nomenclature for six markers from the ISAG comparison- test panel. *Animal genetics*. 43(4):463-467.
25. Cerit, H., Avanus, K. (2007). Sex identification in avian species using DNA typing methods. *World Poultry Science Journal*. 63:91-99.
26. Channing, M. (2017). Transnational Crime and the Developing World. *Global Financial Integrity*. Retrieved on May. 2017 May 30;30:2019.
27. Collar, N. J., Long, A. J., Jaime, P. R. G. (2007). Birds and people: bonds in a timeless journey. *BirdLife Internatinal*, Cambrige, UK.
28. Collar, N. J., Wege, D. C. , Long, A. J. (1997). Patterns and causes of endangerment in the New World avifauna. *Ornithological Monographs*. 237-260.
29. Cook, D., Roberts, M., Lowther, J. (2002). The International Wildlife Trade and Organised Crime. A review of the evidence and the role of the UK. Regional Research Institute, University of Wolverhampton. WWF, UK.

30. Dalsätt, J., Mörs, T., Ericson, P.G. (2006). Fossil birds from the Miocene and Pliocene of Hambach (NW Germany). *Palaeontographica. Abteilung A, Paläozoologie, Stratigraphie*. 277(1-6):113-121.
31. Davitkov, D., Glavinic, U., Nestic, K., Davitkov, D., Vucicevic, M., Nestic, V., Stanimirovic, Z. (2017) Improved DNA-based identification of Cervidae species in forensic investigations. *Acta Veterinaria Beograd*. 67(4):449-458.
32. Davitkov, D, Vucicevic, M, Stevanovic, J, Krstic, V, Tomanovic, S, Glavinic, U, Stanimirovic, Z. (2015) Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia. *Acta Veterinaria Hungarica*. 63 (2) 199-208.
33. Davitkov, D, Vucicevic, M, Glavinic, U, Skadric, I, Nestic, V, Stevanovic, J, Stanimirovic, Z. (2021). Potential of inter- and intra-species variability of CHD1 gene in birds as a forensic tool. *Acta Veterinaria Beograd*. 71 (2) 147-157.
34. De Andrade Silva, K. V. K., Lôbo-Hajdu, G., Alves, M. A. S. (2011). Sex determination in *Turdus amaurochalinus* (Passeriformes: Muscicapidae): morphometrical analysis supported by CHD gene. *Revista de Biología Tropical*. 59(2):789-794.
35. DeYoung, R. W., Honeycutt, R. L. (2005). The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *The Journal of Wildlife Management*. 69(4):1362-1384.
36. Doucet, S. M., Shawkey, M. D., Rathburn, M. K., Mays H. L., JR., Montgomerie, R. (2004). Concordant evolution of plumage colour, feather microstructure, and a melanocortin receptor gene between mainland and island populations of a fairy-wren. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 271:1663-1670.
37. Eason, D., Millar, G. D., Cree, A., Halverson, J., Lambert, D.M. (2001). A comparison of five methods for assignment of sex in the takahe (*Aves: Porphyrio mantelli*). *Journal of Zoology*. 253(3):281-292.
38. Ellegren, H., Lindgren, G., Primmer, C.R., Møller, A.P. (1997). Fitness loss and germline mutations in barn swallows breeding in Chernobyl. *Nature*. 389(6651):593-596.

39. Engler, M., Parry-Jones, R. (2007). Opportunity or threat: the role of the European Union in global wildlife trade. TRAFFIC Europe, Brussel, Belgium, <https://www.traffic.org/>.
40. Ericson, P. G., Anderson, C. L., Britton, T., Elzanowski, A., Johansson, U. S., Källersjö, M., Ohlson, J. I., Parsons, T. J., Zuccon, D., Mayr, G. (2006). Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters*. 2(4):543-547.
41. Farag, M., Imam, T., Dhama, K. (2015). Identification of some domestic animal species (camel, buffalo and sheep) by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial cytochrome b gene. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 3(2):136-142.
42. Freed, L. A., Cann, R. L., Diller, K. (2009). Sexual dimorphism and the evolution of seasonal variation in sex allocation in the Hawaii Akepa. *Evolutionary Ecology Research*, 11:731-57.
43. 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 of the United States of America*, USA, 95, 8147-8152.
44. Fridolfsson, A., Ellegren, H. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*. 30:116-121.
45. Garcia - Moreno, J., Mindell, D. (2000). Rooting a phylogeny with homologous genes on opposite sex chromosomes (Gametologs): A case study using avian CHD. *Molecular Biology and Evolution*. 17(12):1826-1832.
46. Genovart, M., Louzao, M., Igual, J. M., Oro, D. (2008). Digit length may reveal unusual breeding behaviour in a seabird. *Biological Letter*. 4:461-464.
47. Griffiths, R., Korn, R. M. (1997). A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus do domesticus*. *Gene*. 197:225-229.

48. Griffiths, R., Daan, S., Dijkstra, C. (1996). Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 263(1374):1251-1256.
49. Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., Dawson, R. J. G. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*. 7:1071-1075.
50. Griffiths, R., Tiwari, B. (1995). Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*, 375, 454.
51. Gupta, S.K., Verma, S.,K., Singh, L. (2005). Molecular insight into a wildlife crime: the case of a peafowl slaughter. *Forensics Science International*, 154:214-217.
52. Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K. L., Harshman, J., Huddleston, C. J. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320(5884):1763-1768.
53. Handel, C. M., Pajot, L. M., Talbot, S. L., Sage, G. K. (2006). Use of buccal swabs for sampling DNA from nestling and adult birds. *Wildlife Society Bulletin*, 34:1094-1100.
54. Harris, L., Shiraishi, H. (2018). Understanding the global caviar market. Results of a rapid assessment of trade in sturgeon caviar. TRAFFIC, Cambridge, United Kingdom, https://www.traffic.org/site/assets/files/9805/global_caviar_market-1.pdf
55. Harvey, M. G., Bonter, D. N., Stenzler, L. M. (2006). A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *Journal of Field Ornithology*. 77:136-140.
56. Haysom, S. (2018). Digitally Enhanced Responses: New horizons for combating online illegal wildlife trade. The Global Initiative against Transnational Organised Crime, Digital Dangers. <https://globalinitiative.net/wp-content/uploads/2018/06/TGIATOC-Digital-Responses-Report-WEB.pdf>
57. He, P. J., Yu, J. Q., Fang, S. G. (2005). Sex identification of the black swan (*Cygnus atratus*) using the locus-specific PCR and implications for its reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*. 40:196-198.

58. Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., Francis, C. M. (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*. 2(10):312.
59. Hedrick, P. W. (2000). Genetics of populations. Second edition. Jones and Barnett, Sudbury, Massachusetts, USA.
60. Idaghdour, Y., Broderick, D., Korrida., A. (2003). Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards in Morocco. *Conservation Genetics*. 4:789-792.
61. Inskipp, T. P. (1975). All heaven in a rage. A Study into the Importation of Birds into the United Kingdom. *Royal Society for the Protection of Birds: Sandy, Bedfordshire, United Kingdom*, 42.
62. Inskipp, T. P. (1983) The Indian bird trade, *TRAFFIC Bulletin* 5:26-46.
- Inskipp, T. P., Thomas, G. J. (1976). Airborne Birds, a further study of of importation of wild birds into United Kingdom, *Royal Society for the Protection of Birds: Sandy, Bedfordshire, United Kingdom*, 25.
63. Iyengar, A., Hadi, S. (2014). Use of non-human DNA analysis in forensic science: A mini review. *Medicine, Science and the Law*. 54(1):41-50.
64. Jan, C., Fumagalli, L. (2016). Polymorphic DNA microsatellite markers for forensic individual identification and parentage analyses of seven threatened species of parrots (family Psittacidae). *PeerJ*, 4, 2416.
65. Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A. (2014). Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*. 346(6215):1320-1331.
66. Jensen, T., Mace. M., Durrant, B. (2011). Sexing of mid-incubation avian embryos as a management tool for zoological breeding programs. *Zoo Biology*. 31(6):694-704.
67. Jensen, T., Pernasetti, F. M., Durrant, B. (2003). Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. *Zoo Biology*. 22:561-571.

68. Khan, S., Ijaz, J., Hayat, M., Zahra, T., RaZa, M., Abbas, K. (2019). Sex determination by CHD (Chromo helicase DNA binding) gene in local rock pigeons (*Columba livia*) from Lahore, Pakistan. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 7:664-666.
69. Kirkwood, J.K., Duignan, P.J., Kember, N.F., Bennett, P.M., Price, D.J. (1989). The growth rate of the tarsometatarsus bone in birds. *Journal of Zoology*. 217(3):403-416.
70. Lee, J. C., Tsai, L. C., Hwa, P. Y., Chan, C. L., Huang, A., Chin, S. C., Wang, L. C., Lin, J. T., Linacre, A., Hsieh, H. M. (2010). A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Molecular and Cellular Probes*. 24:27-31.
71. Lens, L., Galbusera, P., Brooks, T., Waiyaki, E., Schenck, T. (1998). Highly skewed sex ratios in the critically endangered Taita thrush as revealed by CHD genes. *Biodiversity and Conservation*. 7:869-873.
72. Lipinski, M. J., Amigues, Y., Blasi, M., Broad, T. E., Cherbonnel, C., Cho, G. J., Corley, S., Daftari, P., Delattre, D. R., Dileanis, S., Flynn, J. M. (2007). An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*). *Animal genetics*. 38(4):371-377.
73. Liu, G., Li, C., Du, Y., & Liu, X. (2017). The complete mitochondrial genome of Japanese sparrowhawk (*Accipiter gularis*) and the phylogenetic relationships among some predatory birds. *Biochemical Systematics and Ecology*. 70: 116-125.
74. Livezey, B. C., Zusi, R. L. (2007). Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. *Zoological journal of the Linnean Society*. 149(1):1-95.
75. Mank, J. E., Carlson, J. E., Brittingham, M. C. (2004). A century of hybridization: decreasing genetic distance between American black ducks and mallards. *Conservation Genetics*. 5:395-403.
76. Marini, M. A., Garcia, F. I. (2005). Bird conservation in Brasil. *Conservation Biology*. 19:665-671.

77. Marks J., Leasure S. (1992). Breeding biology of Tristram's Storm- Petrel on Laysan Island. *Wilson Bulletin*. 104:719-731.
78. Mayr, G. (2011). Cenozoic mystery birds—on the phylogenetic affinities of bony- toothed birds (Pelagornithidae). *Zoologica Scripta*. 40(5):448-467.
79. McCormack, J. E., Harvey, M. G., Faircloth, B. C., Crawford, N. G., Glenn, T. C., Brumfield, R. T. (2013). A phylogeny of birds based on over 1,500 loci collected by target enrichment and high-throughput sequencing. *PloS One*. 8(1)e54848.
80. Међународна унија за очување природе и природних ресурса, 2015. <https://srp.agromassidayu.com/mezhdunarodnij-soyuz-ohrani-prirodi-i-prirodnih-resursov-krasnaya-kniga-mezhdunarodnogo-soyuza-ohrani-read-212430> (последњи пут приступљено 20. августа 2021).
81. Mine, O. M., Mochakana, M. E., Mpapho, T., Motlhanka, D. T. M., Kgwatalala, P. (2002). Application of a sex identification technique in juvenile ostriches and its potential application in Botswana. *South African Journal of Animal Science*. 32:160-163.
82. Morgan, J. Chang, S. (2017). Rising internet-based trade in the Critically Endangered ploughshare tortoise *Astrochelys yniphora* in Indonesia highlights need for improved enforcement of CITES. *Oryx*. 52(4):1-7
83. Morinha, F., Cabral, J.A., Bastos, E. (2012). Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*. 78:703-714.
84. Mundy, N. I., Badcock, N. S., Hart, T., Scribner, K., Janssen, K., Nadeau, N. J. (2004). Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice. *Science*. 303:1870-1873.
85. Musing, L. (2019). An overview of seizures of CITES-listed Wildlife in the EU in 2019. TRAFFIC Europe.
https://www.traffic.org/site/assets/files/13563/an_overview_of_seizures_of_cites-listed_wildlife_in_the_eu_in_2019.pdf

86. Nakamura, D., Tiersch, T.R., Douglass, M., Chandler, R.W. (1990). Rapid identification of sex in birds by flow cytometry. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 53: 201-205.
87. Nei, M., Kumar S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, USA.
88. Nelson, W. S., T. Dean, and J. C. Avise. (2000). Matrilineal history of the endangered Cape Sable seaside sparrow inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Molecular Ecology*. 9:809–813.
89. Nesbitt, S.J., Liu, J., Li, C. (2010). A sail-backed suchian from the Heshanggou Formation (Early Triassic: Olenekian) of China. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*. 101(3-4):271-84.
90. Ogden, R., Dawnay, N., McEwing, R. (2009). Wildlife DNA forensics—bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research*. 9(3):179-195.
91. Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M., Steinlechner, M. (2000). Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*. 114(1):23-28.
92. Perktaş, U., Groth, J. G., Barrowclough, G. F. (2020). Phylogeography, species limits, phylogeny, and classification of the turacos (Aves: Musophagidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *American Museum Novitates*. 3949:1-61.
93. Podos, J. (2001). Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin's finches. *Nature*. 409:185–188.
94. Правилник о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива. ("Сл. гласник РС", бр. 5/2010 и 47/2011).
95. Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015). A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*. 526(7574):569-573.
96. Rahim, A., Kumar, S., Sharma, D., Kokate, L. S., Das, A. K., Singh, J. A., Kataria, M. C. (2012). Species and gender identification in diversified

poultry species by PCR analysis of CHD gene. *Indian Journal of Poultry Science*. 47(3):281-6.

97. Rocco, M., Isotti, R. (2006). The Hunting: Italian Country Profile: National Land Pressure, International Hunting Destinations, CITES Species Subjected to Hunting. *WWF-Italy Report*, Rome, Italy.

98. Scribner, K.T., Petersen, M.R., Fields, R.L., Talbot, S.L., Pearce, J.M. and Chesser, R.K. (2001). Sex- biased gene flow in spectacled eiders (Anatidae): Inferences from molecular markers with contrasting modes of inheritance. *Evolution*. 55(10):2105-2115.

99. Sibley, C. G., Ahlquist, J. E., Monroe Jr, B. L. (1988). A classification of the living birds of the world based on DNA-DNA hybridization studies. *The Auk*. 105(3):409-423.

100. Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.

101. Silva, K. V., Lôbo-Hajdu, G., Alves, M. A. (2011). Sex determination in *Turdus amaurochalinus* (Passeriformes: Muscicapidae): morphometrical analysis supported by CHD gene. *Revista de Biología Tropical*. 59:789-794.

102. Silveira, L. F., Straube, F. C. (2008). Aves ameaçadas de extinção no Brasil, 378-669, In: A.B.M.D. Machado, G.M., Paglia, A.P. *In Livro Vermelho da Fauna Brasileira ameaçadas de extinção*. Brasília: Fundação Biodiversitas, Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas Departamento de Conservação da Biodiversidade, Brasil.

103. Simic, D., Tucakov, M. (2005). Pobjeno 38000 prepelica. *Dvogled*. 5-6:6.

104. Simic, D., Tucakov, M., Đapic, D. (2003). Initiative for permanent hunting ban of Quail *Coturnix coturnix* and Turtle Dove *Streptopelia turtur* and their inclusion in the List of Natural Rarities. *Ciconia*. 12:25-30.

105. Sina, S., Gerstetter, C., Porsch, L., Roberts, E., Smith, L. O., Klaas, K., de Castillo, T. F. (2016). Wildlife Crime; Directorate general for internal policies policy department a: economic and scientific policy, commissioned by the

European Parliament, Brussel, 2016.
[http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2016/570008/IPOL_STU\(2016\)570008_EN.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2016/570008/IPOL_STU(2016)570008_EN.pdf).

106. Silva, K.V., Lôbo-Hajdu, G., Alves, M.A. (2011). Sex determination in *Turdus amaurochalinus* (Passeriformes: Muscicapidae): morphometrical analysis supported by CHD gene. *Revista de Biología Tropical*. 59: 789–794.

107. Solari, A. J. (1994). Sex chromosomes and sex determination in Vertebrates, *CRC Press*, London, UK, 1-73.

108. Stanimirovic, Z, Vucinic, M, Soldatovic, B. (1998). Cytogenetic changes in bone marrow cells of wistar rats induced by levamisole hydrochloride. *Acta Veterinaria Beograd*. 48 (4):255-262.

109. Stanimirovic, Z, Vucinic, M, Soldatovic, B, Markovic, B. (1997). Genotoxicity and potential chemosterilant effects of Rosol. *Acta Veterinaria-Beograd*. 47 (4):237-246.

110. Stanimirovic, Z, Vucinic, M, Soldatovic, B, Vucicevic, M. (1995). A large acrocentric chromosome in the first pair of autosomes in natural populations of *Mus musculus*, Linne 1758. *Acta Veterinaria-Beograd*. 45 (2–3):155–160.

111. Stanistic, Lj, Aleksic, J, Dimitrijevic, V, Simeunovic, P, Glavinic, U, Stevanovic, J, Stanimirovic, Z. (2017). New insights into the origin and the genetic status of the Balkan donkey from Serbia. *Animal Genetics*. 48 (5):580-590.

112. Starck, J.M. (1993). Evolution of avian ontogenies. In *Current ornithology* (275-366). Springer, Boston, MA.

113. Stevanov–Pavlovic, M., Vucicevic, M., Bosnjak, J., Stevanovic, J., Dimitrijevic, V., Resanovic, R., Stanimirovic, Z. (2013). Molecular sex determination of 20 bird species protected in the Republic of Serbia. *Acta Veterinaria Beograd*. 63:45-51.

114. Stevanov-Pavlović M, Dimitrijević V, Marić S, Radović D, Stevanović J, Stanimirović Z (2015) Applicability assessment of a standardized microsatellite marker set in endangered Busha cattle. *Slovenian Veterinary Research* 52 (3) 133-139.
115. Suh, A., Kriegs, J. O., Brosius, J., Schmitz, J. (2011). Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 28;2993–2997.
116. Tidemann, S., Gosler, A. (2010). Ethnoornithology: Birds, indigenous people, culture and society. Earthscan/James and James, London, UK.
117. Tiersch, T. R., Mumme, R. L., Chandler, R. W., Nakamura, D. (1991). The Use of Flow Cytometry for Rapid Identification of Sex in Birds. *Auk*. 108(1):206-208.
118. Toufexis, A. (1993). All God's creatures priced to sell. *Time* 142(3):36-41.
119. TRAFFIC (2008). The illegal trade in wild birds from south-east and central Europe for food in the EU. 22 (1).
120. TRAFFIC (2018). Bird's-eye view: Lessons from 50 years of bird trade regulation & conservation in Amazon countries. TRAFFIC International. <https://www.traffic.org/site/assets/files/11517/birds-eye-view.pdf>.
121. TRAFFIC (2020). An overview of seizures of CITES-listed wildlife in the European Union.
122. Verma, S.K., Singh, L. (2003). Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensics application. *Molecular Ecology Resources*. 3:28-31.
123. Volodin, I., Kaiser, M., Matrosova, V., Volodina, E., Klenova, A., Filatova, O., Kholodova, M. (2009). The technique of noninvasive distant sexing for four monomorphic dendrocygna whistling duck species by their loud whistles. *Bioacoustics*. 18:277–290.
124. Vučićević, M., Stevanović, J., Simeunović, P., Vučićević, I., Đelić, N., Stanimirović, Z., Stojić, V. (2012). Analysis of the CHD gene for sex determination of protected bird species, Proceedings of the International symposium on hunting,

»Modern aspects of sustainable management of game population«, June 22–24, Zemun-Belgrade, Serbia, 83-86.

125. Vučićević, M., Stevanović, J., Vučićević, I., Pantelić, A., Đelić, N., Resanović, R., Stanimirović, Z. (2012). Sex determination in game birds management, Proceedings of the International symposium, on hunting, »Modern aspects of sustainable management of game population« 22. – 24. June, 91-94, Zemun- Belgrade, Serbia.

126. Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N., Stanimirovic, Z. (2013). Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biology*, 32(3):269-276.

127. Wang, Z.J., Chen, G.J., Zhang, G.J., Zhou, Q. (2021). Dynamic evolution of transposable elements, demographic history, and gene content of paleognathous birds. *Zoological research*. 18(1):51.

128. Warchol, G.L (2004) The international illegal wildlife trafficking. *Criminal Justice Studies: a Journal of Crime, Law and Society*. 17(1):57–73.

129. Warchol, G.L., Zupan, L.L., Clack, V. (2003). Transnational criminality: an analysis of the illegal wildlife market in Southern Africa. *International Criminal JusticeReview*. 13(1):1–27.

130. Weston, M. K., Memon, M. A. (2009). The illegal parrot trade in Latin America and its consequences to parrot nutrition, health and conservation. *Bird Population*. 9:76-83.

131. Wetmore, A. (1934). A systematic classification for the birds of the world, revised and amended. Smithsonian Miscellaneous Collections.

132. Whittingham, L. A., Dunn, P. O. (2000., Offspring sex ratios in tree swallows: females in better condition produce more sons. *Molecular Ecology*. 9:1123–1129.

133. Zhao, Y., Kong, X., Robertson, H. A., Saul, E. K., Nia, L. V., Chan, C. H., Chambers, K. G. (2009). Combining morphometric and molecular approaches improves accuracy of sexing in the kakerori (*Pomarea dimidiata*) on Rarotonga, Cook Islands. *Notornis*. 56:49–53.

134. Zink, R. (1997). Phylogeographic studies on North American birds, In D. P. Mindell, editor. Avian molecular evolution and systematics. Academic Press, San Diego, California, USA, 301-324.

Прилог 1.

Табела 18. Степен заштите испитиваних врста

Врста (латински назив)	CITES*	Бонска конвенција**	Црвена листа врста***	РС правилник****
<i>Tyto alba</i>	II	/	LC	P1
<i>Glaucidium passerinum</i>	II	/	LC	P1
<i>Athene noctua</i>	II	/	LC	P1
<i>Bubo bubo</i>	II	/	LC	P1
<i>Strix aluco</i>	II	/	LC	P1
<i>Buteo buteo</i>	II	2	LC	P1
<i>Haliaeetus albicila</i>	II	1	LC	P1
<i>Neophron percnopterus</i>	II	1	EN	P1
<i>Accipiter nisus</i>	2	2	LC	P1
<i>Accipiter gentilis</i>	2	2	LC	P1
<i>Gyps fulvus</i>	2	2	LC	P1
<i>Aquila heliaca</i>	1	1	VU	P1
<i>Falco tinnunculus</i>	II	2	NT	P1
<i>Amazona albifrons</i>	II	/	LC	/
<i>Amazona barbadensis</i>	I	/	VU	/
<i>Amazona aestiva</i>	II	/	NT	/
<i>Amazona finchi</i>	I	/	EN	/

<i>Amazona ochrocephala</i>	II	/	LC	/
<i>Amazona albigena</i>		/		/
<i>Ara ararauna</i>	II	/	LC	/
<i>Ara chloroptera</i>	II	/	LC	/
<i>Ara macao</i>	I	/	LC	/
<i>Ara nobilis</i>	II	/	LC	/
<i>Pssitacus erithacus</i>	I	/	EN	/
<i>Polytelis swainsonii</i>	II	/	LC	/
<i>Pyrrhura molinae</i>	II	/	LC	/
<i>Pyrrhura conura</i>		/		/
<i>Pionites melanocephala</i>	II	/	LC	/
<i>Cacatua moluccensis</i>	I	/	VU	/
<i>Cacatua alba</i>	II	/	EN	/
<i>Cacatua sulphurea</i>	I	/	CR	/
<i>Ciconia ciconia</i>	/	2	LC	P1
<i>Anas platyrhynchos</i>	/	/	LC	P2
<i>Cygnus cygnus</i>	/	2	LC	P1
<i>Tadorna ferruginea</i>	/	/	LC	P1
<i>Carduelis spinus</i>	III	/	LC	P1
<i>Carduelis carduelis</i>	I	/	LC	P1
<i>Luscinia megarhynchos</i>	III	/	LC	P1
<i>Phasianus colchicus</i>	II	/	LC	P2

<i>Coturnix coturnix</i>	/	2	LC	P2
<i>Gallus gallus domesticus</i>	/	/	/	/
<i>Pavo cristatus</i>	/	/	/	/
<i>Phoenicopterus roseus</i>	II	2	LC	P1
<i>Columba livia</i>	/	/	LC	P1
<i>Scolopax rusticola</i>	/	/	LC	P2

*I – vrsta se nalazi u CITES прилогу 1; II – vrsta se nalazi u CITES прилогу 2;

** 1- vrsta је заштићена Бонском конвенцијом и налази се у Прилогу 1; 2- vrsta је заштићена Бонском конвенцијом и налази се у прилогу 2;

- ***
- o Extinct (EX) - ишчезла
 - o Extinct in the wild (EW) – ишчезла у дивљини;
 - o Critically Endangered (CR) – крајње угрожена;
 - o Endangered (EN) – угрожена;
 - o Vulnerable (VU) – рањива;
 - o Near Threatened (NT) – потенцијално угрожена;
 - o Least Concern (LC) – мала забринутост;
 - o Data Deficient (DD) – недостатак података;
 - o Not Evaluated (NE) – неоцењена;

****P1 – vrsta се налази у прилогу 1 Правилника о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива (Службени гласник РС, бр. 5 од 5. фебруара 2010, 47 од 29. јуна 2011, 32 од 30. марта 2016, 98 од 8. децембра 2016); P2 – vrsta се налази у прилогу 2 наведеног правилника.

Прилог 2.

Изглед добијених секвенци од врсте *Bucorvus leadbeateri* са свим подацима који су депоновани у електронску базу

```
>Feature      Seq1
<1      >669  gene
                gene  CHD1-Z
<1      112  mRNA
609     >669
                gene  CHD1-Z
                product  chromo-helicase-DNA binding protein-Z
<1      112  CDS
609     >669
                gene  CHD1-Z
                codon_start  2
                product  chromo-helicase-DNA binding protein-Z
                transl_table  11
                translation
<1      112  exon
                gene  CHD1-Z
                number    17
113     608  intron
                gene  CHD1-Z
                number    17
609     >669  exon
                gene  CHD1-Z
                number    18
```

Прилог 3.

Изглед добијених секвенци од врсте *Neophron percnopterus* са свим подацима који су депоновани у електронску базу

```
>Feature      Seq3
<1      >452  gene
                gene  CHD1-W
<1      112  mRNA
396     >452
                gene  CHD1-W
                product  chromo-helicase-DNA binding protein-W
<1      112  CDS
396     >452
                gene  CHD1-W
                codon_start  2
                product  chromo-helicase-DNA binding protein-W
                transl_table  11
<1      112  exon
                gene  CHD1-W
                number      17
113     395  intron
                gene  CHD1-W
                number      17
396     >452 exon
                gene  CHD1-W
                number      18
```

Прилог 4.

Изглед добијених секвенци од врсте *Ara ararauna* са свим подацима који су депоновани у електронску базу

<1 >603 gene

gene CHD1-Z

<1 112 mRNA

588 >603

gene CHD1-Z

product chromo-helicase-DNA binding protein-Z

<1 112 CDS

588 >603

gene CHD1-Z

codon_start 2

product chromo-helicase-DNA binding protein-Z

transl_table 11

<1 112 exon

gene CHD1-Z

number 17

113 587 intron

gene CHD1-Z

number 17

588 >603 exon

gene CHD1-Z

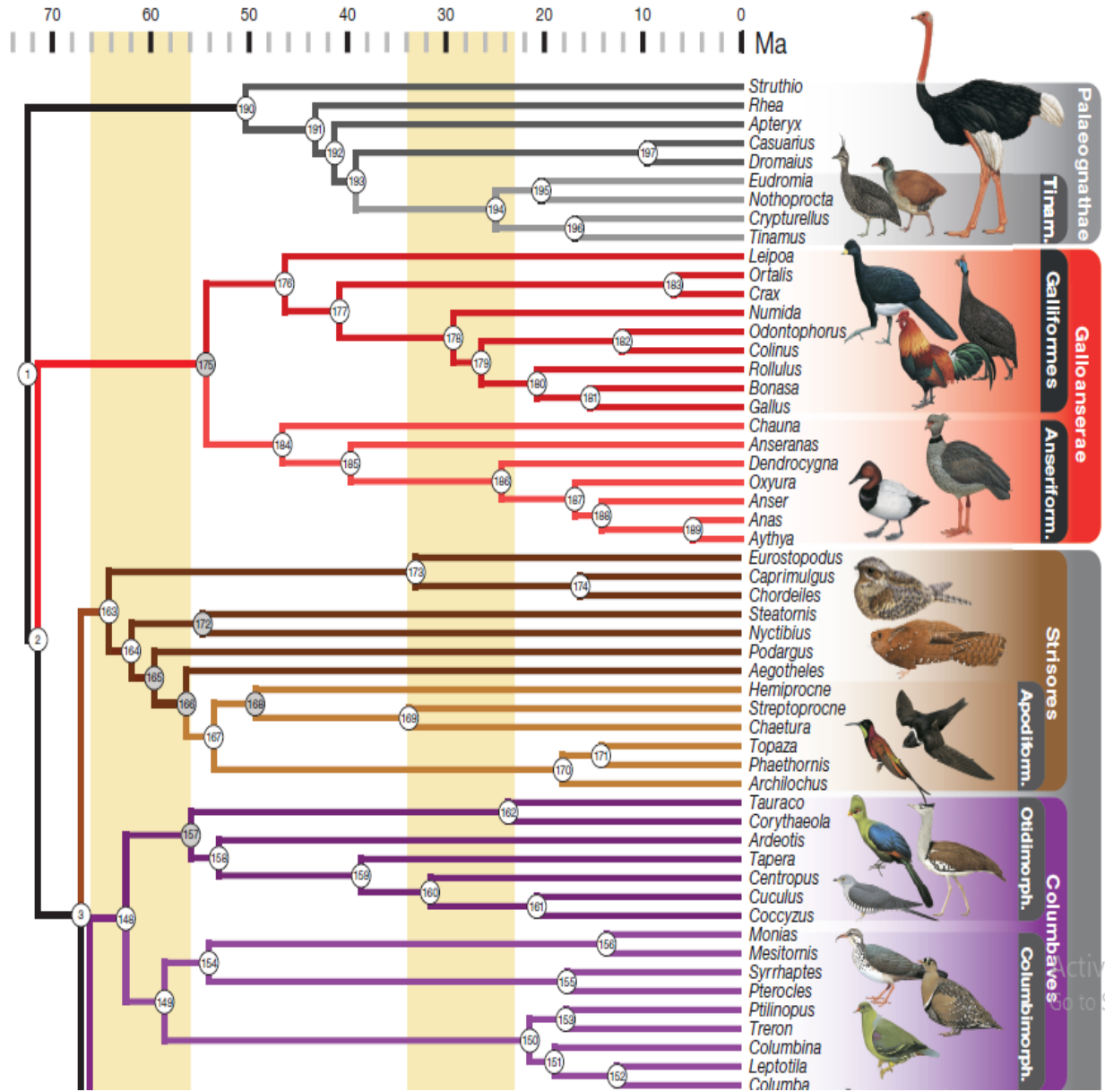
number 18

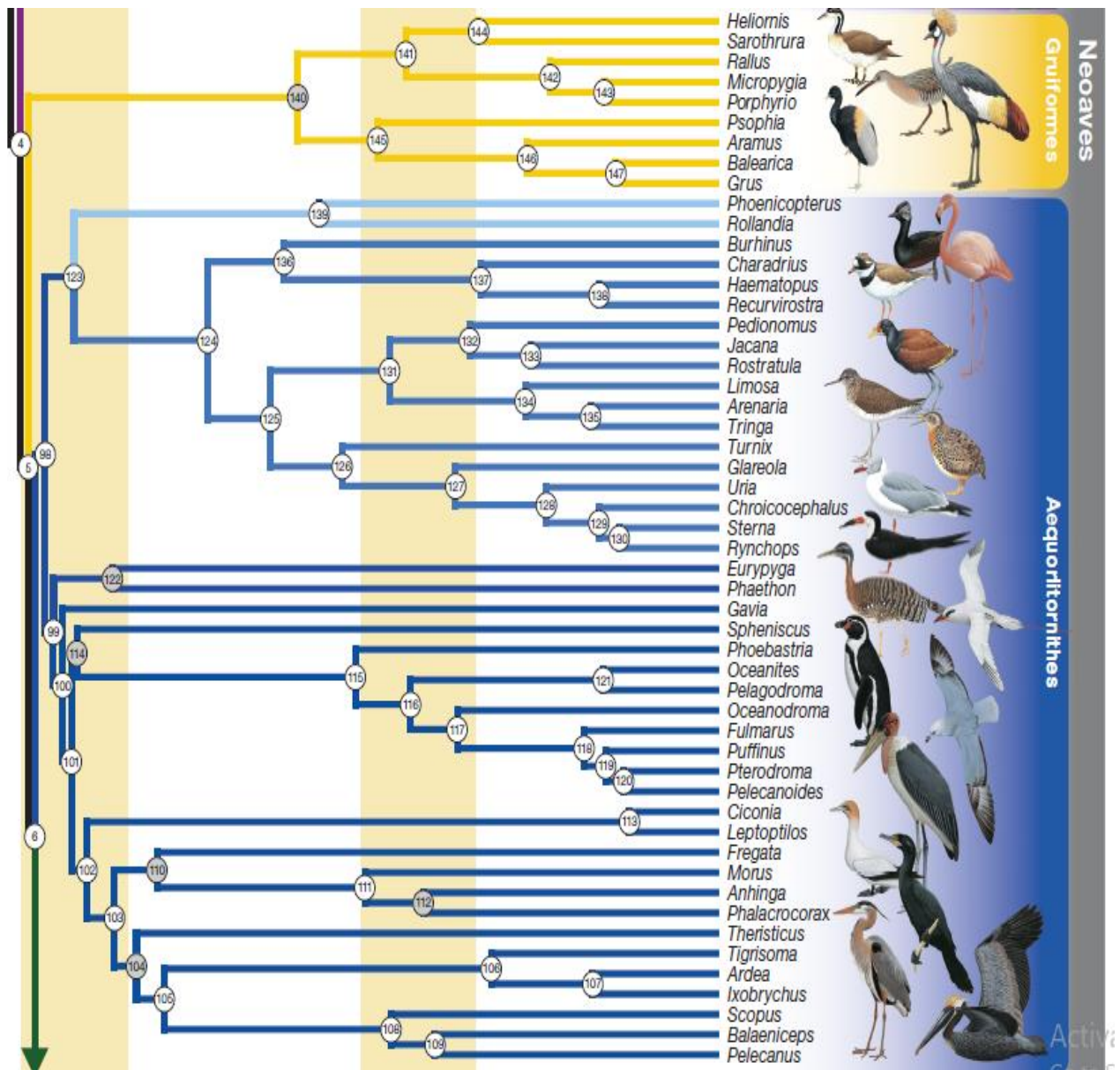
Прилог 5.

Табела 18а. Приказ десет земаља на свету у које се илегално извозе папагаји из Јужне Америке (<https://www.traffic.org/site/assets/files/11517/birds-eye-view.pdf>)

Земља	Број увежених врста
Јужна Африка	64
Холандија	57
Швајцарска	54
Белгија	53
Данаска	47
САД	46
Сингапур	42
Велика Британија	42
Немачка	39
Шпанија	36

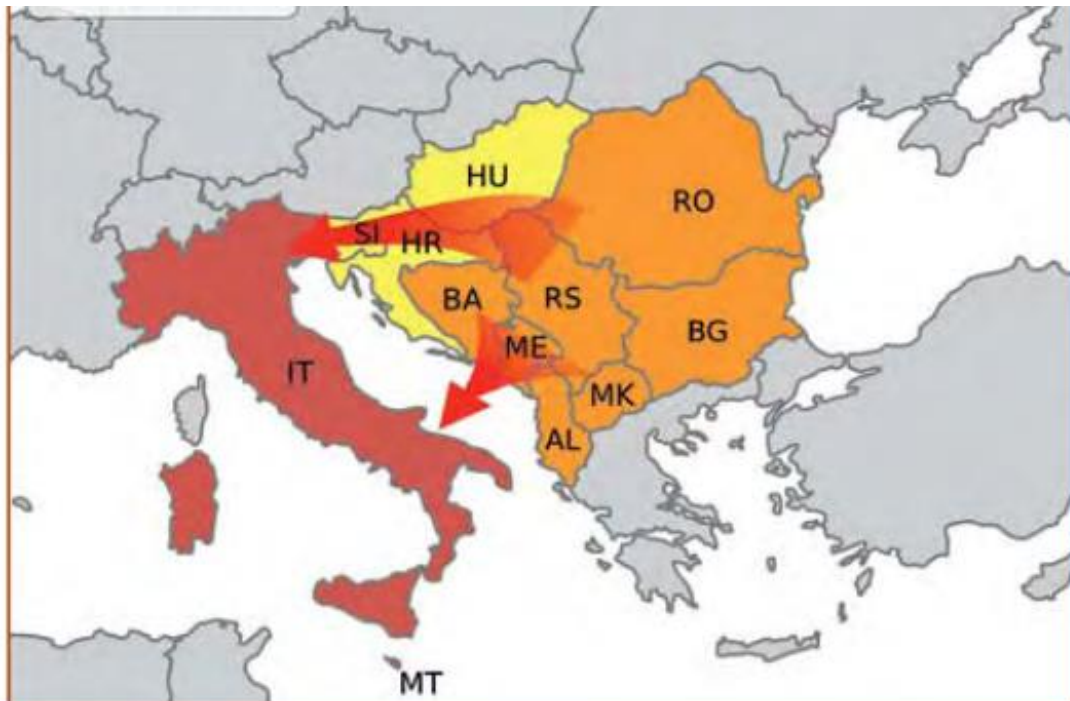
Слика 5. Изглед до сада израђеног филогенетског стабла птица (Prum и сар., 2015)



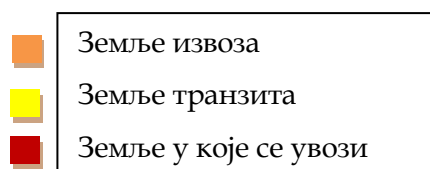


Слика 5а. Лов и трговина птицама из југоисточне и централне Европе

(https://www.traffic.org/site/assets/files/3754/illegal_trade_wild_birds_for_food_europe.pdf)



Легенда: Албанија (AL), Босна и Херцеговина (BA), Бугарска (BG), Македонија (МК), Црна Гора (ME), Србија (RS), Румунија (RO); Хрватска (HR), Мађарска (HU), Словенија (SI), Италија (IT), Малта (MT).



БИОГРАФИЈА

Дајана Давитков (дев. Слијепчевић) је рођена 18. 07. 1990. год. у Мостару. Основну школу и гимназију завршила је у Требињу. Студије ветеринарске медицине у Београду уписала је 2009. год., а дипломирала је 26. јуна 2015. год. са просечном оценом 9,76 (девет 76/100). Током студија награђивана је пет пута од стране Факултета поводом Дана Факултета у периоду од 2010-2015. године. Добитник је и бројних стипендија (стипендија Министарства просвете, науке и технолошког развоја за 2010/2011, 2011/2012; 2012/2013; стипендија Фонда за младе таленте за 2014/2015; стипендија Задужбина Драгољуба Маринковића за период 2013/2014, стипендија Темпус пројекта за стручну праксу у Будимпешти у 2015. години). Такође, 2016. год. Ректорат Универзитета у Београду доделио јој је повељу намењену најбољем дипломираном студенту Факултета ветеринарске медицине у школској години дипломирања. Након дипломирања, уписала је докторске академске студије на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Тренутно је на трећој години, а до сада је положила све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 9,94 (девет 94/100).

Као истраживач приправник од 01. марта 2016. год. учествује на пројекту "Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране" (Ев. бр. ИИИ46002, руководилац проф. др Зоран Станимировић), који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Поред тога завршила је приправнички стаж у Наставној болници за мале животиње на Катедри за болести копитара, месоједа, живине и дивљачи Факултета ветеринарске медицине у Београду.

Кандидаткиња је до сада, као аутор и коаутор, објавила 20 научних и стручних радова, од тога осам радова у међународним часописима са SCI листе (два рада категорије M21, четири рада категорије M22 и два рада категорије

M23) и пет радова у часопису националног значаја (M51). Учествовала је на више конгреса и скупова који су одржани у Србији и у иностранству. Од 2018. године бави се педагошким радом на Катедри за судску ветеринарску медицину и законске прописе, на којој држи практичну наставу из предмета Судска ветеринарска медицина и Законски прописи у ветеринарској медицини. Током свог рада на Катедри обавила је укупно 248 патоморфолошких прегледа различитих врста животиња (пси, мачке, рибе, птице, дивљач). Говори енглески, руски и италијански језик.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Дајана С. Давитков

број уписа 2015/5001

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација полно специфичних секвенци ДНК у циљу форензичког испитивања врсте и пола заштићених птица

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

Потпис докторанда

У Београду, 23.11.2021.

Дајана Давитков

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Дајана С. Давитков

Број уписа 2015/5001

Студијски програм Докторске академске студије

Наслов рада Карактеризација полно специфичних секвенци ДНК у циљу
форензичког испитивања врсте и пола заштићених птица

Ментори: проф. др Владимир Нешић и проф. др Зоран Станимировић

Потписана Дајана С. Давитков

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 23. 11. 2021.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација полно специфичних секвенци ДНК у циљу форензичког испитивања врсте и пола заштићених птица

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 23.11.2021.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.