

Feasibility of universal CHD1 sexing markers in various bird orders

N. Ágh^{1,2,5*}
Sz. Kovács^{3,5}
E. Nemesházi^{3,4}
K. Szabó³

1. Állatorvostudományi Egyetem,
Biomatematikai és
Számítástechnikai Tanszék
H-1078 Budapest, István utca 2.

*e-mail: Czikkelyne.Agh.Nora@univet.hu

2. Magyar Tudományos
Akadémia – Pannon Egyetem,
Limnológia Tanszék, Evolúciós
Ökológia Kutatócsoport
H-8200 Veszprém,
Wartha Vince utca 1.

3. Állatorvostudományi Egyetem,
Ökológiai Tanszék, Konzerváció-
genetikai Kutatócsoport
H-1077 Budapest, Rottenbiller utca 50.

4. Magyar Tudományos Akadémia,
Agrártudományi Kutatóközpont,
Növényvédelmi Intézet, Lendület
Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport
H-1022 Budapest, Herman Ottó út 15.

5. Ócsai Madárvárta Egyesület
H-1089 Budapest, Orczy út 43. I/13.

Univerzális, ivarhatározáshoz használt CHD1 markerek alkalmazhatósága különböző madárrendekben

Ágh Nóra^{1,2,5*}, Kovács Szilvia^{3,5}, Nemesházi Edina^{3,4}, Szabó Krisztián³

ÖSSZEFOGLALÁS

A madarak ivarának pontos ismerete kulcsfontosságú lehet mind tudományos kutatásokban, mind a tenyésztői munka során. Ez azonban nagyon sok madárfajnál, különösen fiókakorban, csak molekuláris módszerekkel lehetséges. Régóta ismertek olyan genetikai eljárások, amelyekkel az elkülönült ivari kromoszómákkal rendelkező madarak nagy része határozható, de ezek az univerzálisan alkalmazott módszerek sem egyformán sikeresek az egyes fajokban vagy az eltérő szövettípusokban. Vizsgálatukban a szerzők négy univerzális CHD1 (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1) markert elemeztek 13 madárrend több mint 60 fajában, különböző szövettípusokon. Eredményeik alapján értékelték az adott fajra jellemző diagnosztikus PCR-termékeket, ill. az egyes markerek felhasználási korlátjait.

SUMMARY

Background: Defining the sex of individual birds can be crucial for scientific studies and captive breeding, as well. However, many bird species (and almost all nestling) can only be sexed via molecular methods. Universal diagnostic primers that can sex most birds are used widely, most commonly those that are based on amplifying differently sized fragments of the CHD1 (Chromo-helicase DNA binding protein 1) gene on the sex chromosomes. Still, little is known about their reliability in several avian orders or in different tissue samples.

Objectives: The aim of this research was to test four frequently used universal bird sexing markers in 13 Neognathae bird orders and in different sample types. These markers (P2/P8, 2550F/2718R, CHD1-i16 and CHD1-i9) amplify fragments of intronic regions of the CHD1-Z and CHD1-W genes. Samples of more than 60 bird species and various tissue types (feathers of different sizes, dried and fluid blood) were tested. Amplified CHD1 fragments were visualized with UV light, following agarose gel electrophoresis.

Results and Discussion: Our results confirm the universality of these primer pairs in most avian orders, but their application needs some consideration. 21% of the small size feathers gave no detectable results. The marker CHD1-i9 did not work in 14.5% of the feather samples. Such error occurred only in 4% of blood samples. The marker P2/P8 needed the longest electrophoresis time, but did not yield visible sex-specific bands even after 120 minutes in nine species. Similarly, no sex-specific bands were detected with 2550F/2718R in seven species. In CHD1-i16, aspecific bands making sexing diagnosis difficult were common, and even after improving the protocol, four species gave inconsistent results. In conclusion, these four markers can be assumed as near universal, easy-to-use tools for molecular sexing of Neognathae birds, but they all have some limitations. When choosing a marker for molecular sexing, not only the species, but also the tissue sample should be taken into consideration. We suggest to avoid the CHD1-i9 marker when using small or degraded feather samples. P2/P8 is not recommended when the size difference between the two sex chromosome-linked fragments is too small.

A madarak természetes populációinak vizsgálatakor és a tenyésztői munka során is fontos lehet az egyedek ivarának meghatározása. A konzervációbiológiában sokszor ivari különbségeket is figyelembe kell venni a természetvédelmi programok megtervezésénél és sikerük megítélésénél. A tenyésztői munkával kapcsolatos ivarhatározás gazdasági szempontból is jelentős szerepet tölthet be.

A madarak ivarmeghatározásának nincs általánosan használható módszere

Az ivar pontos meghatározása madarak esetén azonban nem mindig kézenfekvő. A fajok egy része ivari dimorfizmust mutat a tollazat színezetében (8, 31, 41) vagy egyéb biometriai jellemzőkben (23, 34, 37). Számos esetben azonban külső ivari bélyegek hiányában a hímek és a tojók legfeljebb csak a költési időszakban, a kotlófolt és a kloákadudor alapján különíthetők el (41). Ez a bélyeg viszont nem egyértelmű azoknál a fajoknál, ahol a hímek is részt vesznek a kotlásban, mint például a harkályféléknél (*Piciformes*) (6). Többféle kutatás foglalkozott egy minél gyorsabb és pontosabb ivarhatározási technika kifejlesztésével, azonban a legtöbb módszernek komoly korlátai vannak. Természetes populációkban a méretbeli dimorfizmus sokszor kevert, átvonuló populációk esetén nem ad pontos eredményt (14), a korcsoportokban eltérő mértékű lehet (1, 15) és a vedlés után megváltozhat (38). Az egyéb technikák, mint például a két szeméremcsont (os pubis) közötti távolság mérése (34), a laparoszkópia (39) vagy a laparotómia viszont invazív eljárás (5) és vadon élő fajokon általában nem alkalmazhatóak. A legszélesebb körben a DNS-alapú módszerek terjedtek el, kihasználva azt, hogy az újmadár-szabásúak alosztályába (*Neognathae*) tartozó madaraknál az ivari kromoszómák dimorfizmust mutatnak. A tojók esetén két különböző ivari kromoszóma (Z és W) van jelen, ezért a csak náluk meglévő W-kromoszómára specifikus génszekvenciák kimutatása jó lehetőséget ad a molekuláris ivarhatározáshoz. Ezzel szemben a futómadár-szabásúak alosztályába (*Paleognathae*) tartozó fajokban – mint például a strucc (*Struthio camelus*) vagy az emu (*Dromaius novaehollandiae*) – a W és Z ivari kromoszómák alakban és méretben nem különböznek el (43).

A DNS-alapú ivarmeghatározási módszerek széles körben elterjedtek

A molekuláris határozás kezdetben rövid szakaszú, nem specifikus (pl. RAPD, AFLP) primerekkel és mikroszatellitákkal zajlott, mivel a kisebb méretű W-kromoszóma számos ismétlődő génszakaszt tartalmaz. Ezeknél a technikáknál egyetlen primerpár akár 10–20 különböző szakaszt is felszaporíthat, amik között található csak a W-kromoszómára jellemzőket is (9). Azonban ezeknek a módszereknek több hibája is volt: a véletlenszerűen felszaporított polimorf DNS-szakaszok (RAPD) nehezen reprodukálhatóak, a mikroszatelliták esetén pedig gyakran téves azonosítást figyeltek meg (21, 35). Az amplifikált fragmentumhossz-polimorfizmus (AFLP) alapján GRIFFITHS és ORR egy megbízható módszert dolgozott ki strucc ivarmeghatározására, három W-kromoszómához kötődő marker alapján (20). Azonban ez az eljárás nagyon hosszú, alapos előkészületet igényel és igen költséges (4).

A genetikai ivarmeghatározáshoz a hosszpolimorfizmuson alapuló molekuláris módszerek a legsikeresebbek

A genetikai ivarhatározáshoz ezért azok a hosszpolimorfizmuson alapuló technikák bizonyultak a legsikeresebbnek, amelyek olyan genomi szakaszokat (ún. gametológokat) szaporítanak fel, amelyek a két ivari kromoszómán eltérő hosszúságúak (2). A módszerben legelterjedtebben használt gén az egérben felfedezett CHD1, ami a kromo-helikáz DNS-kötő fehérje kódolásáért felel és madarakban is megtalálható a homológja (10). Ez a gén nagyon konzervatív és a CHD1-Z és CHD1-W változat között jól detektálható különbség van az intronikus régiók hosszában (17, 36). Kezdetben ehhez a génhez olyan primereket használtak, amelyek azonos méretű szakaszokat sokszorosítottak mindkét kromoszómán, de egy restriktív enzim kezeléssel, a nukleotidsorrendbeli különbségek miatt, az egyik kromoszóma terméke emésztődött (pl. 10). A később kifejlesztett primereknél, mint pl. a P2/P8 (19), a 2550F/2718R (17) vagy a 1237L/1272H (pl.

A felhasznált szövetminták vér és tollak voltak

30) már nem volt szükség emésztési lépésre az elkülönítéshez. Lehetőség van továbbá a génbankból nyert szekvenciák alapján saját primerek tervezésére is egy-egy problémásabb fajcsoport CHD1 génjére (pl. 18), vagy egyéb gének ivari dimorfizmust mutató intronikus régióra pl. NIPBL gén (*Drosophila* Nipped-B homológ) intron16 (40) vagy ATP5A1 gén (ATP szintetáz alfa-alegység izoform 1) intron3 (13).

A CHD1 gén konzervatív jellege miatt az alkalmazott primerek nagyrészt univerzálisak, bár néhány taxon esetén mégsem működnek egyforma megbízhatósággal. Vucicevic és mtsai 58 madárfajjal készített összehasonlító vizsgálata alapján pl. az uhu (*Bubo bubo*) esetén egyik használt primerpár (P2/P8, 2550F/2718R) sem adott egyértelmű eredményt (45). A pontos azonosítás más fajcsoportok esetén is gondot jelentett korábban, mint például a galambalakúak (Columbiformes) (32) vagy a darualakúak esetén (Gruiformes) (33).

A vizsgálatokban az alkalmazott primerek mellett a felhasználandó szövetminta típusát is jól kell megválasztani. Ha egy védett fajt kívánunk vizsgálni és azt a lehető legkisebb mértékben szeretnénk zavarni, akkor a tollgyűjtés tűnik előnyösebbnek (42). A vérminták azonban sokkal több DNS-t tartalmaznak (24) és így kevés mintából is elegendő mennyiségű örökítő anyagot tudunk kinyerni, ami nagyobb sikerességet jelent a meghatározásban (24, 29). A tollak esetén figyelembe kell venni a tollak méretét és állapotát, mivel a kipreparált szövetrész minősége befolyásolhatja a molekuláris munka sikerességét (25, 26, 44). Ha a vedlés után több hét eltelik, akkor a környezeti hatásoknak (pl. eső, pára, UV fény) kitett tollakban károsodik a DNS és még a rövidebb felszaporítható szakaszok is nehezen mutathatók ki (44).

Jelen kutatásban ezért két fontos kérdésre kerestük a választ: egyrészt vizsgálni szeretnénk, hogy a CHD1 génre fejlesztett négy ivarhatározó primerpár milyen pontossággal használható többféle madárrenden, ill., hogy az eltérő szövetminták (különböző méretű tollak, szűrőpapíron vagy alkoholban tárolt vér) milyen hatékonysággal adnak megbízható eredményt. Vizsgálataink alapján szeretnénk összeállítani egy általánosan használható laborprotokollt, ami minden olyan kutatásban felhasználható, ahol madarak molekuláris ivarhatározása szükséges, de a vizsgált fajra vonatkozó specifikus módszerről nincs előzetes információnk.

SAJÁT VIZSGÁLATOK

ANYAG ÉS MÓDSZER

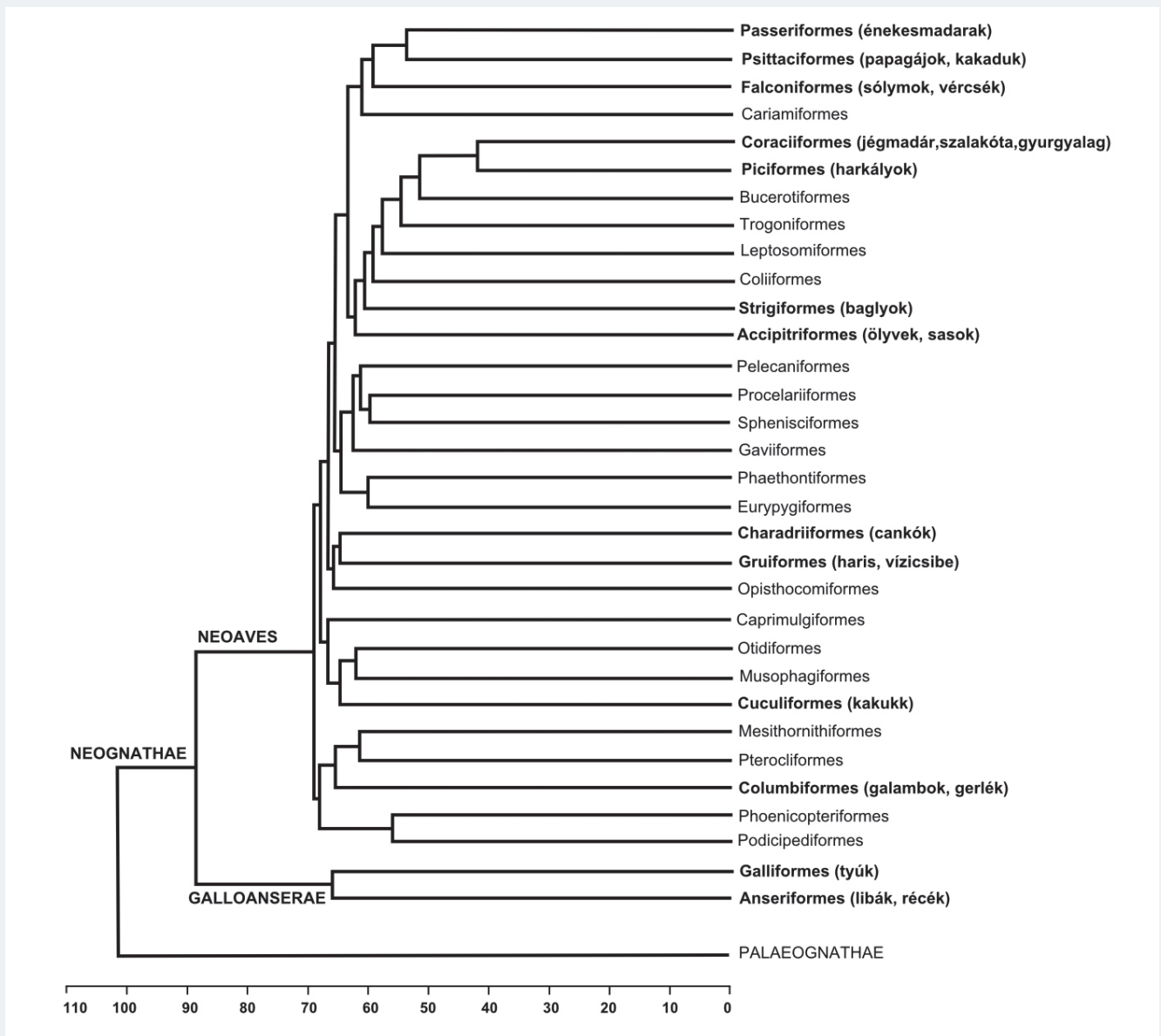
Mintavétel

A vizsgálat során az újmadár-szabásúak közé tartozó 13 madárrend fajait elemezték

Vizsgálatunk során az újmadár-szabásúak alosztályába tartozó 13 madárrend fajaiból gyűjtöttünk szövetmintát az összehasonlításhoz (1. ábra). Elsősorban olyan fajokat kerestünk, amelyek konzerváció-genetikai, viselkedésbiológiai vizsgálatokban vagy éppen az állatorvosi praxisban gyakoriak, ill. a madártenyésztők gyakran tartják őket. A minták több forrásból származtak.

A parlagi sas (*Aquila heliaca*), a rétisas (*Haliaeetus albicilla*) és a kék vércse (*Falco vespertinus*) esetén az illetékes nemzeti parkok gyűjtési engedéllyel rendelkező munkatársai, az éves gyűjtési program keretében gyűjtöttek tollmintát fiókáktól és vedlett tollakat felnőtt egyedektől. A többi, vadon élő fajtól származó minták négy kutatócsoporttól érkeztek, úgymint az Ócsai Madárvártán és a Debreceni Egyetemen folyó kutatásokból, a Szalakóta Life projektől, a széncinege (*Parus major*) minták pedig a Pannon Egyetem Ornitológiai Kutatócsoportjától. A vizsgálatban szereplő többi faj mintái a Nyíregyházi Állatpark és tenyésztők által beküldött toll- és vérminták voltak. A vérmintákat a madarak szárnyvénájából vették és 96%-os etanolban, száraz szűrőpapíron vagy vattán tárolták. A papagájfajoknál és a kutatócsoportoktól érkezett fajok egy részénél rendelkezésünkre álltak ismert ivarú egyedektől gyűjtött szövetminták is, amik a

további vizsgálatokban referenciaként szolgáltak. A minták feldolgozása az Állatorvostudományi Egyetem Ökológiai Tanszékén a Konzerváció-genetikai Kutatócsoport laboratóriumában történt. Valamennyi mintát -20°C -on, fagyasztóban tároltuk és minden esetben egy hónapon belül megkezdtük a feldolgozásukat.



1. ÁBRA. A vizsgálatba bevont fajok (amelyek a félkövérrel jelölt 13 madárrendbe tartoznak) elhelyezkedése a madarak filogenetikai törzsfáján (JARVIS és mtsai, 2014 alapján; a számok millió éveket jelentenek) (27)

FIGURE 1. Distribution of the studied species (belonging to 13 bird orders that are marked bold) on the phylogenetic tree of birds (after JARVIS et al., 2014) (27)

DNS kivonás

A DNS kivonását minden mintatípus esetében (toll, vér) kereskedelmi forgalomban kapható genomi DNS-izoláló kitékkel (pl. GeneAid Genomic DNA Mini Kit (Tissue), Macherey-Nagel NucleoSpin®), a gyártó utasításait követve végeztük. Tollminták esetén az emésztési lépésben 1M DTT-t (1,4-ditio-treitol) is adtunk az elegyhez, hogy a száru jobb emésztését elősegítsük (46).

A PCR-vizsgálat minden esetben 17 µl végtérfogatban zajlott

A polimeráz láncreakció (PCR) minden esetben 17 µl végtérfogatban zajlott, az alábbi összetétel szerint: 1-60 ng DNS templát 3 µl pufferben feloldva, 0,065µl DreamTaq™ (Fermentas) polimeráz enzim, 1,7 µl 10x DreamTaq™ puffer (Fermentas), 0,65 µl dNTP Mix (2 mM, Fermentas), 0,65 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl primer mix (5 pmol/µl) és 8,94 µl desztillált víz.

Négy, az ebbe az alosztályba tartozó fajokra univerzális primerpárt teszteltünk a molekuláris ivarhatározáshoz: P2/P8 (19), 2550F/2718R (16), CHD1-i16F/R és CHD1-i9F/R (40). Mind a négy primerpár működési elve azonos, miszerint eltérő méretű intronikus szakaszokat szaporítanak fel a W- és a Z-kromoszómák CHD1-génjén, így ivartól függően hímegekben egyféle (CHD1-Z), tojókban pedig kétféle (CHD1-Z és CHD1-W) PCR-termék keletkezik. A CHD1-i16-marker használatakor a specificitás növelése érdekében minden esetben „touchdown” lépést (a primertapadási hőmérséklet fokozatos csökkentése ciklusonként a megfelelő értékig) is alkalmazni kellett a PCR során, mivel anélkül aspecifikus szakaszok szaporodtak fel, több faj esetén a CHD1-W szakasz méretének megfelelő hossz közelében (1. táblázat).

1. TÁBLÁZAT. A PCR során alkalmazott „touchdown” lépés részletei a CHD1-i16 primer esetén

TABLE 1. Details of the „touchdown” style PCR in the case of the CHD1-i16 primer

		Hőmérséklet Temperature	Időtartam Time
Denaturálás		95 °C	2 min
„Touchdown” lépés 9 ciklus: -1 °C/ciklus 9 cycle: -1 °C/cycle	Denaturálás Denaturation	95 °C	30 s
	Primertapadás Annealing	60–52 °C	45 s
	Láncépítés Elongation	72 °C	45 s
28 ciklus 28 cycle	Denaturálás Denaturation	95 °C	30 s
	Primertapadás Annealing	52 °C	45 s
	Láncépítés Elongation	72 °C	45 s
Végső láncépítés Final extension		72 °C	7 min

A PCR-termékek szétválasztását agaróz-gélelektroforézissel végezték

Gélelektroforézis

A PCR-termékek szétválasztását agaróz-gélelektroforézissel végeztük, 2%-os agaróz (Lonza SeaKem® LE) gélen 20 000-szeres hígítású festéssel (ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution; Pacific Image Electronics, Inc.). Mivel a kimutatott PCR-termékek az alkalmazott primerpároktól és vizsgált madárfajtól függően eltérő mérettartományba esnek (16, 19, 40), markerenként eltérő idejű (60–120 perc) futásokat használtunk.

A mintatípusok összehasonlításakor a nagyobb tollak és az alkoholban tárolt vér bizonyult a legeredményesebben használhatónak

EREDMÉNYEK

Szövetmintatípusok összehasonlítása

A mintatípusok összehasonlításakor a nagyobb tollak és az alkoholban tárolt vér bizonyult a legeredményesebben használhatónak. Az egyes mintatípusokból izolált DNS átlagos koncentrációi a következők voltak: alkoholban tárolt vér: 12,89 ng/µl; szűrőpapíron vagy vattán tárolt vér: 19,89 ng/µl; kisméretű testtollak: 8,5 ng/µl; nagyobb testtoll: 30,45 ng/µl. Az izolált 315 darab tollmintából 14 kisebb

(3 cm alatti) testtoll és 299 darab kivedlett evező vagy fark toll volt. A testtollak esetén 21%-ban (3 db) volt sikertelen a PCR-reakció, mivel egyik primerpár esetén sem kaptunk értékelhető eredményt. A nagyobb tollaknál ez az arány jóval kisebb, mindössze 2% (6 db) volt. A tollminták esetén a CHD1-i9 primer nem minden esetben volt használható, az esetek 14,5%-ban nem volt termék, 35%-ban pedig csak a W-kromoszómához köthető, kisebb (kb. 700 bp) intronszakasz volt kimutatható. A vérminták esetén az alkoholban tárolt vér izolálása gyorsabban kivitelezhető volt. A szűrőpapíron vagy vattán érkezett minták is csak az esetek 4%-ában (5 minta a vizsgált 118-ból) nem adtak egyértelmű eredményt (2. és 3. ábra).

2. ÁBRA. Különböző felhasznált szövetminta típusok jákópapagájban (*Psittacus erithacus*)
 1. testtoll/pihetoll; 2. frissen vedlett közepes méretű toll; 3. frissen vedlett nagyméretű toll; 4. vér szűrőpapíron

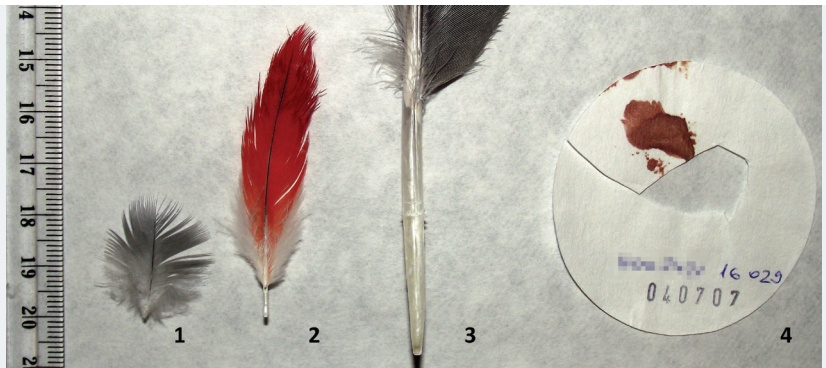


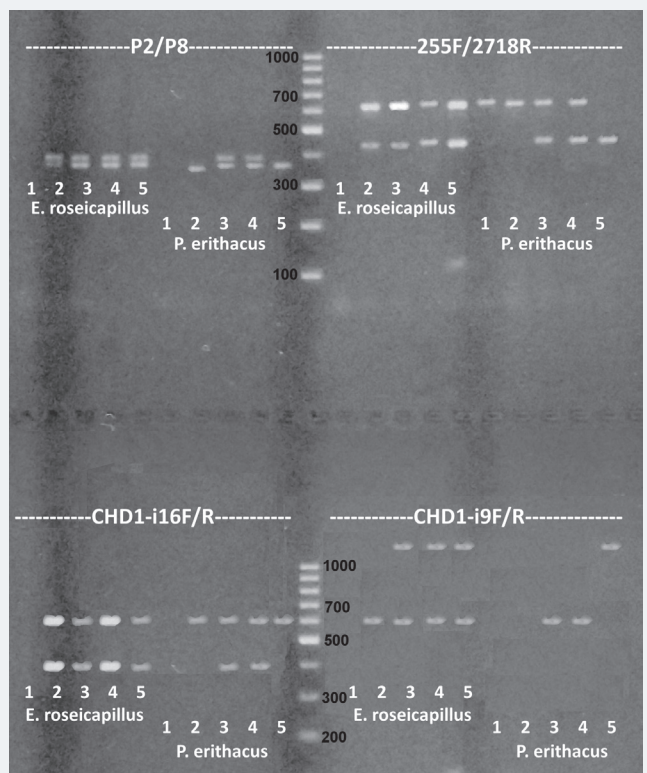
FIGURE 2. Different types of tissue samples in African grey parrot (*Psittacus erithacus*)
 1. body feather/body down feather; 2. fresh moulted, medium sized feather; 3. fresh moulted, large feather; 4. blood on filter-paper

3. ÁBRA. Különböző szövetmintákon végzett ivarhatározás sikeressége két gyakran vizsgált papagájfaj esetén. A két fajnál az azonos sorszám ugyanahhoz az egyedhez tartozó mintákat jelöl

1. testtoll/pihetoll (1–3 cm hosszú); 2. frissen vedlett, közepes méretű toll (4–7 cm hosszú); 3. frissen vedlett, nagyméretű toll (7 cm-nél hosszabb); 4. vér szűrőpapíron; 5. Vér alkoholban

FIGURE 3. Success of the molecular sexing with different sample types in two often studied parrot species. Within species, the same sample numbers belong to the same individuals

1. body feather/body down feather (1–3 cm long); 2. fresh moulted, medium sized feather (4–7 cm long); 3. fresh moulted, large feather (longer than 7 cm); 4. blood on filter-paper; 5. blood stored in alcohol



Az egyes markerek jellemzői a különböző madárrendekben

Az egyik leggyakrabban használt primerpárnál, a P2/P8-nál a termékek mérete a sólyomalakúak (*Falconiformes*) rendjébe tartozó fajok esetén és a nádi tücsökmadárnál (*Locustella luscinioides*) 450–490 bázispár (W-kromoszóma), ill. 360–450 bázispár (Z-kromoszóma) volt, a többi madárrendben 300 és 450 bázispár nagyságú szakaszokat kaptunk. A két termék közötti méretkülönbség több faj

esetén is mindösszesen 10–20 bázispár volt (ennél a primerpárnál, eltérően a másik három markertől, az általunk vizsgált fajoknál mindig a CHD1-W szakasz a hosszabb). Néhány fajban a hosszabb futási idő (120–180 perc) ellenére is csak egy PCR-terméket sikerült kimutatni, mint pl. a nagy fakopáncs (*Dendrocopus major*), az egerészölyv (*Buteo buteo*), a rétisas, a parlagi sas vagy a kakukk (*Cuculus canorus*) esetében (2. táblázat). Ezeknél tehát vagy csak az egyik kromoszóma CHD1-fragmentje szaporodott fel, vagy olyan kicsi volt a méretkülönbség, hogy az általunk alkalmazott agarózgél-elektroforézissel nem voltak elkülöníthetőek a termékek. A nyári lúd (*Anser anser*) esetén hosszú futási idő után szétvált a két PCR-termék, a kis méretkülönbség miatt azonban ez nehezen volt azonosítható.

2. TÁBLÁZAT. A négy használt primerpár W-és Z-kromoszómákon lévő változatainak közelítő fragmenthossza bázispárban megadva ("x": primerek nem adtak terméket). Az „N” a mintaelemszámot jelöli.

TABLE 2. Estimated lengths of the amplified CHD1-W and CHD1-Z fragments (given in base pair) in the four used sexing primers (x: primers failed to amplify). N means the sample size.

Rend/Család/ Faj		P2/P8		2550F/2718R		CHD1-i16		CHD1-i9	
Order/Family/ Species	N	W	Z	W	Z	W	Z	W	Z
Anseriformes Anatidae									
<i>Anser anser</i>	20	<330	<330	500	x	410	510	600	1300
Galliformes Phasianidae									
<i>Gallus gallus</i>	3	380	360	450	600	400	550	800	>1000
Accipitriformes Accipitridae									
<i>Aquila heliaca</i>	20	390		450	700	430	650	600	>1000
<i>Buteo buteo</i>	3	390		450	650	400	650	500	>1000
<i>Haliaeetus albicilla</i>	20	400		450	750	400	700	600	>1000
Gruiformes Rallidae									
<i>Crex crex</i>	4	400	390	300	550	>1000	550	650	x
<i>Rallus aquaticus</i>	3	410	400	x	650	>1000	550	700	x
Charadriiformes Scolopacidae									
<i>Calidris pugnax</i>	2	400		400	600	350	600	600	1000
<i>Tringa glareola</i>	2	400		400	600	350	600	600	1000
Columbiformes Columbidae									
<i>Columba livia</i>	10	390	380	450	680	400	650	600	x
<i>Streptopelia decaocto</i>	4	390	380	450	650	400	650	650	x
Cuculiformes Cuculidae									
<i>Cuculus canorus</i>	5	380		700	>1000	600	>1000	500	1000

Strigiformes									
Strigidae									
<i>Asio otus</i>	3	380	370	1100	650	1100	600	550	>1000
<i>Otus scops</i>	8	360	350	1100	650	1100	600	500	1000
<i>Strix spp.</i>	4	350		1100	650	1100	600	600	>1000
Coraciiformes									
Coraciidae									
<i>Coracia Garrulus</i>	20	350	300	400	600	400	550	600	>1000
Alcedinidae									
<i>Alcedo atthis</i>	2	400	380	450	600	400	520	600	>1000
<i>Dacelo novaeguineae</i>	2	390	340	400	700	x	600	600	>1000
Meropidae									
<i>Merops apiaster</i>	12	390	350	500	630	400	580	500	1000
Piciformes									
Picidae									
<i>Dendrocopos major</i>	3	400		550	650	420	550	650	x
Falconiformes									
Falconidae									
<i>Falco peregrinus</i>	7	460	450	500	650	440	700	600	1000
<i>Falco rusticolus</i>	1	460	450	500	800	440	700	600	1000
<i>Falco vespertinus</i>	20	450	360	500	770	440	600	600	1000
Psittaciformes									
Cacatuidae									
<i>Cacatua spp.</i>	34	400	380	420	600	450	650	600	>1000
<i>Eolophus roseicapilla</i>	25	390	370	550	600	400	600	600	>1000
<i>Nymphicus hollandicus</i>	11	450	390	450	650	500	650	600	>1000
Psittacidae									
<i>Amazona spp.</i>	28	400	390	400	650	450	650	600	>1000
<i>Ara spp.</i>	60	390	380	450	700	450	650	600	>1000
<i>Aratinga nenday</i>	5	390	370	450	650	450	650	600	>1000
<i>Bolborhynchus lineola</i>	4	390	380	400	650	450	650	x	x
<i>Myiopsitta monachus</i>	7	390	360	400	700	450	700	600	>1000
<i>Pionites spp.</i>	10	390	380	400	650	450	650	600	>1000
<i>Poicephalus senegalus</i>	23	330	310	450	x	400	600	600	>1000
<i>Psittacus erithacus</i>	69	390	370	550	600	500	650	600	>1000
<i>Pyrrhura spp.</i>	34	390	380	400	600	450	650	600	>1000
Psittaculidae									
<i>Alisterus spp.</i>	8	330	310	300	650	300	650	700	>1000
<i>Polytelis spp.</i>	8	330	310	300	650	300	650	600	>1000
<i>Psittacula spp.</i>	90	390	380	450	700	400	600	650	>1000
<i>Trichoglossus spp.</i>	11	340	310	450	700	450	650	600	x

Passeriformes									
Oriolidae									
<i>Oriolus oriolus</i>	1	380	360	500	650	400	600	550	1000
Corvidae									
<i>Garrulus glandarius</i>	3	390	360	500	700	400	600	550	1000
Passeriformes									
Oriolidae									
<i>Oriolus oriolus</i>	1	380	360	500	650	400	600	550	1000
Corvidae									
<i>Garrulus glandarius</i>	3	390	360	500	700	400	600	550	1000
Paridae									
<i>Parus major</i>	10	390	310	450	650	400	650	650	x
<i>Periparus ater</i>	10	390	350	x	650	400	600	550	1000
<i>Poecile palustris</i>	10	390	350	500	650	400	600	650	x
Phylloscopidae									
<i>Phylloscopus sp.</i>	30	390	370	x	650	400	600	650	>1000
Acrocephalidae									
<i>Acrocephalus spp.</i>	20	390	370	450	650	x	500	700	>1000
<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	10	390	370	450	650	x	500	700	1000
Locustellidae									
<i>Locustella luscinioides</i>	7	490	390	450	650	400	600	650	>1000
Sylviidae									
<i>Sylvia sp.</i>	13	390	370	450	650	400	600	600	>1000
Sturnidae									
<i>Sturnus vulgaris</i>	1	400	380	450	650	400	600	600	>1000
<i>Lamprotonis superbus</i>	2	320	300	450	600	x	x	700	>1000
Turdidae									
<i>Turdus sp.</i>	7	390	370	x	700	420	650	700	x
Muscicapidae									
<i>Erithacus rubecula</i>	10	370	350	500	650	400	600	700	1000
<i>Luscinia spp.</i>	1	400	380	500	650	400	600	550	1000
<i>Phoenicurus spp.</i>	1	320		450	650	400	600	700	>1000
<i>Saxicola rubetra</i>	2	400	360	x	700	400	600	650	>1000
Passeridae									
<i>Passer montanus</i>	12	390	360	450	650	400	600	550	1000
Prunellidae									
<i>Prunella modularis</i>	10	390	370	450	650	400	600	550	1000
Fringillidae									
<i>Carduelis carduelis</i>	3	400	360	x	650	400	600	600	1000
<i>Carpodacus rubicilla</i>	28	350	340	450	700	450	650	650	>1000
Emberizidae									
<i>Emberiza calandra</i>	3	380	360	500	650	400	600	550	1000

A 2550F/2718R primerpár használatával az énekesmadár-alakúak (Passeri-formes), papagájalakúak (Psittaciformes), szalakótaalakúak (Coraciiformes), vágómadár-alakúak (Accipitriformes) és galambalakúak (Columbriformes) rendfajainál a W-kromoszómán lévő szakasz mérete 400 és 550 bázispár, a Z-kromoszómán lévő szakasz mérete 600 és 700 bázispár közötti volt, a két szakasz között 100-200 bázispárnyi különbséggel. A bagolyalakúak (Strigiformes) és kakukk esetén ettől teljesen eltérő hosszúságú termékek voltak megfigyelhetők: a CHD1-W-szakasz 1000 bázispárnál hosszabb, míg a CHD1-Z-szakasz 650-700 bázispár hosszúságú volt (1. táblázat). A CHD1-W-szakasz néhány fajban, mint pl. a szenegáli papagáj (*Poicephalus senegalus*), a fenyvescinege (*Periparus ater*), a rozsdás csuk (*Saxicola rubetra*) és a guvat (*Rallus aquaticus*) nem szaporodott fel.

A CHD1-i16-marker esetén a kapott PCR-termékek mérete a darualakúak (Gruiformes) és a bagolyalakúak (Strigiformes) rendet és a kakukkot leszámítva 300-500 bázispár (W-kromoszóma) és 500-700 bázispár (Z-kromoszóma) között volt, legalább 100 bázispárnyi különbséggel.

A bagolyalakúak (Strigiformes) rendben és a kakukk esetén a CHD1-W szakasz 1000 bázispárnál hosszabb, míg a CHD1-Z szakasz 600 bázispár hosszú, a darualakúak (Gruiformes) rendben a CHD1-Z szakasz 550 bázispár hosszú volt (2. táblázat). Néhány faj esetén a rövidebb, W kromoszómán lévő fragment nem szaporodott fel, így nem volt alkalmas a nádiposzátákban (*Acrocephalus spp.*) és a pompás fényserégélyben (*Lamprotornis superbus*) a tojók azonosítására. A rétisas, a guvat és a nyári lúd esetén pedig a módosított PCR profil ellenére is több alkalommal az azonosítást megnehezítő fragment szaporodott fel CHD1-W szakaszon (400-600 bp között).

A CHD1-i9 marker W kromoszómán lévő szakasza minden vizsgált madárrendben 500-800 bázispár méretű, a CHD1-Z-szakasz minden faj esetén 1000 vagy annál több (kb. 1100-1300) bázispár hosszúságú volt. Ez a primerpár a tollminták 14,6%-ában egyáltalán nem adott terméket, a vérminták 4-6%-ában pedig a hosszabb, CHD1-Z-fragment nem szaporodott fel. Néhány fajnál ez a probléma minden esetben fennállt, hogy csak a W-kromoszómán lévő szakasz szaporodott fel, például az énekes rigó (*Turdus philomelos*), a barátcinege (*Poecile palustris*), a nagy fakopáncs, a haris (*Crex crex*) és a guvat esetén. Így ezeknél a fajoknál, a fragmentek hosszában megfigyelhető nagy variabilitás miatt, nem ajánlott ivarhatározásra. A Katalin-papagáj (*Bolborhynchus lineola*) volt az egyetlen faj, ami a tesztelés során egyszer sem volt meghatározható ezzel a primerrel, ugyanis egyik kromoszómához tartozó szakasz felszaporítása sem volt sikeres még vérmintáknál sem.

MEGVITATÁS

A madarak esetén a legmegbízhatóbb ivarmeghatározást a molekuláris módszer jelenti

A molekuláris ivarhatározás madarak esetén általában megbízhatóan használható, szemben a viselkedés megfigyelésével vagy az egyes testméretek alapján történő határozással. A rendelkezésre álló technikák fejlődésével már nem csak a felnőtt madarak, de a még tojásban lévő embriók szexálása is megoldható (28). A minták gyűjtésekor és a vizsgálat megtervezésekor azonban figyelembe kell venni a rendelkezésre álló szövetminták típusát. Eredményeink alapján a vérminták akár alkoholban voltak tárolva, akár szűrőpapírral lettek felitatva, megbízhatóan használhatóak. A tollminták esetén azonban a toll mérete és állapota jelentősen befolyásolta a sikerességet (pl. 25, 44). A kisméretű tollak vizsgálata 21%-ban sikertelennek bizonyult, akárcsak a korábbi vizsgálatok eredményei alapján a régebben kivedlett tollak. Ennek hátterében az állhat, hogy az ilyen mintákban kevesebb mennyiségű, erősebben szétterjedezett DNS található (44).

Az alkalmazni kívánt módszer (primerpár) kiválasztása ezért összefügg a szö-

vetminta típusával, mivel a várható termékméretetek meghatározzák az azonosítás sikerét. A legrövidebb szakaszokat felszaporító P2/P8 primer alkalmas lehet lebomlott szövetminták, vagy a tojásban lévő fióka ivarhatározásához is (29), mivel az általunk vizsgált mintatípusok esetén mindegyikében sikeresen kimutatható DNS-terméket eredményezett. Azonban a két kromoszómához kötődő változatok méretei között ennél a primernél volt a legkisebb a különbség, ezért több fajnál hosszú (akár 120 perces) elválasztási időre is szükség lehet, ill. egyes fajoknál ez sem elegendő az allélok egyértelmű elkülönítéséhez. Így fennáll a veszélye annak, hogy a tojókat hamisan hímnak lehet detektálni. A nagyobb felbontás érdekében ennél a primerpárnál a költségesebb akril-amid gél használatát javasolják, pl. a vörösbegy (*Erithacus rubecula*) vagy a bagolyalakúak (*Strigiformes*) rendjébe tartozó fajok esetén (3, 45). Az eredményeink alapján viszont ezeknél a fajoknál is jól meghatározható az ivar agarózgél-elektroforézis segítségével, mindössze a macskabagoly (*Strix aluco*), a maláj erdeibagoly (*Strix leptogrammica*), nagy fakopáncs, az egerészölyv, a rétisas, a parlagi sas, a nyári lúd és a kakukk esetén tapasztaltuk, hogy nem válik szét jól láthatóan a két kromoszómához tartozó szakasz. A másik három primer előnye, hogy a két fragment között jóval nagyobb a méretkülönbség és akár már 30–40 perces gélelektroforézist követően is azonosíthatóvá válnak a termékek. Friss szövetminták esetén jól használhatóak, csupán tollmintáknál fordult elő, hogy az CHD1i9 és CHD1i16 primerek alkalmazásával az 1000 bázispárnál hosszabb termékek nem minden esetben szaporodtak fel. A legtöbb fajnál a 2550F/2718R és a CHD1i16 primerpár bizonyult a legmegbízhatóbbnak.

Egyes madárfajoknál nem mindig volt egyértelmű eredmény a CHD1-gén alapú ivar-meghatározáskor

Némely madárrend esetén a CHD1-géneken alapuló molekuláris ivarhatározás nem mindig járt egyértelmű eredménnyel. Korábbi, több fajon végzett kutatásokban a baglyoknál (*Strigiformes*) az ivarhatározás gyakran sikertelen volt (5, 19, 30, 45). Módszertani fejlesztésként a Z37B primerpárt javasolták Dawson és mtsai (7) ezekre a fajokra, azonban az általuk talált fragmentek között nagyon kicsi méretkülönbség volt (2–19 bázispár) és a szétválasztáshoz kapilláris-elektroforézist használtak. Saját kutatásunk során viszont azt tapasztaltuk, hogy négy bagolyfaj esetén agarózgél-elektroforézissel is azonosíthatók az ivarok, csak a P2/P8 primerpár nem adott egyértelmű eredményt a macskabagoly és a maláj erdeibagoly esetén. Mind a négy bagolyfajban a CHD1-W-változat a 2550F/2718R és a CHD1i16 primer esetén szokatlan módon 1000 bázispárnál hosszabb terméket adott. Kizártuk annak lehetőségét, hogy mellékterméket kaptunk volna, mivel csak azokban a mintákban jelent meg ez a termék, ahol a másik két primer alapján egyértelműen tojót határoztunk vagy előzetes ismeretünk volt az egyedről.

Tollminta esetén a frissebb, nagyobb méretű tollakat válasszuk

A 13, újmadár-szabásúak alosztályba (*Neognathae*) tartozó madárrend több mint 60 fajával végzett vizsgálat során megállapíthatjuk, hogy az aspecifikus, univerzális markerek, amiket széles körben használnak ivarmeghatározásra, jól alkalmazhatóak a legtöbb általunk vizsgált fajban. Azonban mindegyik primer esetén vannak limitáló tényezők, amiket a vizsgálatok során figyelembe kell venni. Tapasztalataink alapján a madarak molekuláris ivarmeghatározásánál az alábbi eljárások betartását javasoljuk:

(1) A szövetminta megválasztásakor, ha a toll mellett döntünk, akkor minél hamarabb kezdjük meg a minták izolálását és a DNS kivonását.

(2) Tollgyűjtés esetén a minél nagyobb méretűt (pl. evezőtoll, faroktoll) válasszuk, ill. vedlett toll esetén a frissebbeket. A fajok ivari kromoszómái evolúciós léptékben mérve gyorsan változnak (12, 13, 22), emiatt előfordulhatnak olyan fajok, amelyekre egy adott marker egyáltalán nem működik (pl. mutáció lehet a primerek kötőhelyein), vagy nem megbízhatóan működik (csak ez egyik kromoszómán lévő gametológot szaporítja fel). Továbbá a nagyobb madárrendekben, mint pl. az énekesmadár-alakúak (*Passeriformes*) vagy a papagájalakúak (*Psittaciformes*) esetében egyik vagy másik primerpár nem az adott csoportra

jellemző méretű terméket adja. A mi esetünkben ezt tapasztaltuk két ausztráliai papagájnembem (*Alisterus* és *Polytelis*), amelyeknél a CHD1-W-termék jóval rövidebb (300 bp) a 2550F/2718R és a CHD1-i16-marker esetén is, mint a többi papagájfajban (400–500 bp; 2. táblázat).

(3) Ha nincs előzetes adatunk arról, hogy az általunk választott faj ivarhatározásához melyik primer használható a legmegbízhatóbban, akkor tollminták esetén kerüljük a hosszú, 1000 bázispár feletti terméket adó markereket (mint pl. a CHD1-i9), mert a nagy termékméret miatt fragmentált DNS-nél nem mindig ad eredményt. A jó minőségű, vélhetően sok DNS-t tartalmazó szövetminták esetén (pl. vér, tokos fiókakori toll, frissen vedlett nagyméretű toll) a négy primerpár bármelyike használható, azonban érdemes figyelembe venni, hogy a P2/P8 primerekkel sokszorozott PCR-termékek elválasztása hosszú idejű elektroforézist igényelhet. Az esetlegesen keletkező műtermékek elkerülése érdekében a CHD1-i16 primerek használatakor javasolt az ún. „touchdown” PCR-protokoll alkalmazása.

(4) Bizonyos fajok esetén a jól működő markerek sem adnak megbízható eredményt, mint pl. a guvatnál, harisnál vagy a kakukknál. Éppen ezért, hogy elkerüljük a téves határozásokat, azt javasoljuk, hogy olyan fajnál, ahol nem találunk információt a markerek megbízhatóságáról, ott minden esetben minimum 2–3 primerpárral kezdjük a meghatározást, szövetmintától függetlenül. ill. érdemes ismert ivarú egyedektől is mintát venni, hogy az esetleges felszaporodó műtermékeket kizárhassuk.

(5) A gélelektroforézis során pedig szem előtt kell tartani, hogy a Z és W változat között mekkora a méretbeli különbség, mert kis különbség esetén sűrűbb géle és hosszabb futási időre lehet szükség.

Összefoglalva, az általunk megadott szempontokat figyelembe véve és a primer-tesztelésen végighaladva a legtöbb madárrend esetén könnyen kivitelezhetővé válik a molekuláris ivarhatározás. Reméljük, hogy az összeállított protokoll hozzájárul a gyorsabb és eredményes kutatástervezésekhez.

A legtöbb madárrend esetén könnyen kivitelezhető a molekuláris ivarhatározás

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönjük a szövetmintákat DR. PAP PÉTER LÁSZLÓNAK, DR. PAZÁR PÉTERNEK, a Pannon Egyetem Ornitológiai Kutatócsoportjának, az Ócsai Madárvárta Egyesületnek, a Duna-Dráva Nemzeti Park munkatársainak, a Parlagisas-védelmi Munkacsoportnak, a Kékvércse-védelmi Munkacsoportnak, a Szalakóta Life program munkatársainak, a Nyíregyházi Állatpark munkatársainak, KOLESZÁR BALÁZSNAK, UHNER ANTALNAK a Magyar Galamb- és Kisállattenyésztők Országos Szövetség elnökének, az Anser-Branch Ltd.-nek és a madártenyésztőnek, akik az Aquilaborba mintát küldtek. Köszönjük JAKAB SZILVIÁNAK, VILI NÓRÁNAK, TAKÁCS NÓRÁNAK és SZEKERES SÁNDORNAK a labormunkában nyújtott segítségét. A kutatás finanszírozását a Nemzet Fiatal Tehetségei Ösztöndíj Program NTP-NFTÖ-16-0493. és az OTKA 108571. pályázatok tették lehetővé.

IRODALOM

- ALATALO, R. V. – GUSTAFSSON, L. – LUNDBERG, A.: Why do young passerine birds have shorter wings than older birds? *Ibis.*, 1984. 126. 410–415.
- BOUTETTE, J. B. – RAMSAY, E. C. et al.: An improved polymerase chain reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism assay for gender identification in birds. *J. Avian Med. Surg.*, 2002. 16. 198–202.
- CATRY, P. – CAMPOS, A. et al.: Winter segregation of migrant European Robins *Erithacus rubecula* in relation to sex, age and size. *J. Avian Biol.*, 2004. 35. 204–209.
- CERIT, H. – AVANUS, K.: Sex determination by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 2007a. 31. 371–374.
- CERIT, H. – AVANUS, K.: Sex identification in avian species using DNA typing methods. *World's Poultry Sci J.*, 2007b. 63. 91–100.
- CRAMP, S.: *The Complete Birds of the Western Palearctic on CD-ROM*. 1998. Oxford University edition
- DAWSON, D. A. – BREKKE, P. et al.: A marker suitable for sex-typing birds from degraded samples. *Con. Gen. Res.*, 2015. 7. 337–343.

8. DMITRENOK, M. – PUGLISI, L. et al.: Geographical variation, sex and age in Great Bittern. *Ibis.*, 2007. 149. 37–44.
9. DUBIEC, A. – ZAGALSKA-NEUBAUER, M.: Molecular techniques for sex identification in birds. *Biol. Lett.*, 2006. 43. 3–12.
10. ELLEGREN, H.: First Gene on the Avian W Chromosome (CHD) Provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 1996. 263. 1635–1641.
11. ELLEGREN, H.: Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends Ecol. Evol.*, 2000. 15. 188–192.
12. ELLEGREN, H.: Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nature Rev. Gen.*, 2011. 12. 157–166.
13. ELLEGREN, H. – CARMICHAEL A.: Multiple and independent cessation of recombination between avian sex chromosomes. *J. Genet.*, 2001. 158. 325–331.
14. ELLRICH, H. – SALEWSKI, V. – FIEDLER, W.: Morphological sexing of passerines: not valid over larger geographical scales. *J. Ornithol.*, 2010. 151. 449–458.
15. FRANCIS, C. M. – WOOD, D. S.: Effects of age and wear on wing length of Wood-Warblers. *J. Field Ornithol.*, 1989. 60. 495–503.
16. FRIDOLFSSON, A. K. – ELLEGREN, H.: A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J. Avian Biol.*, 1999a. 30. 116–121.
17. FRIDOLFSSON, A. K. – ELLEGREN, H.: A simple and universal method for molecular sexing of birds. *J. Avian Biol.*, 1999b. 30. 401–404.
18. GHORPADE, P. B. – GUPTA, P. K. et al.: Molecular sexing of threatened Gyps vultures: an important strategy for conservation breeding and ecological studies. *SpringerPlus.*, 2012. 1. 62.
19. GRIFFITHS, R. – DOUBLE, M. C. et al.: A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.*, 1998. 7. 1071–1075.
20. GRIFFITHS, R. – ORR, K.: The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Mol. Ecol.*, 1999. 8. 671–674.
21. GRIFFITHS, R. – TIWARI, B.: The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 1993. 90. 8324–8326.
22. HANDLEY, L. J. L.: Evolutionary strata on the Chicken Z chromosome: implications for sex chromosome evolution. *J. Gen.*, 2004. 167. 367–376.
23. HARNOS, A. – CSÖRGŐ, T.: Ivarmeghatározás biometriai adatok alapján – esettanulmány a csilpcsalpüzikére. *Ornis Hun.*, 2011. 19. 40–52.
24. HARVEY, M. G. – BONTER, D. N. et al.: A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *J. Field Ornithol.*, 2006. 77. 136–140.
25. HOGAN, F. E. – COOKE, R. et al.: Optimizing the use of shed feathers for genetic analysis. *Mol. Ecol. Res.*, 2008. 8. 561–567.
26. HORVÁTH, M. B. – MARTÍNEZ-CRUZ, B. – NEGRO, J. J. – KALMÁR, L. – GODOY, J. A.: An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *J. Avian Biol.*, 2005. 36. 84–88.
27. JARVIS, E. D. – MIRARAB, S. et al.: Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 2014. 346. 1320–1331.
28. JENSEN, T. – MACE, M. – DURRANT, B.: Sexing of mid incubation avian embryos as a management tool for zoological breeding programs. *Zoo Biol.*, 2012. 31. 694–704.
29. JENSEN, T. – PERNASETTI, F. M. – DURRANT, B.: Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane, blood vessels and feathers. *Zoo Biol.*, 2003. 22. 561–571.
30. KAHN, N. W. – JOHN, J. ST. – QUINN, T. W.: Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. *Auk*, 1998. 115. 1074–1078.
31. KIMBALL, R. T. – MARY, C. M. ST. – BRAUN, E. L.: A macroevolutionary perspective on multiple sexual traits in the Phasianidae (Galliformes). *Int. J. Evol. Biol.*, 2011. 2011. 1–16.
32. LEE, J. C. I. – TSAI, L. C. et al.: A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Mol. Cell. Probe.*, 2010. 24. 27–31.
33. LIU, H. – LI, J. et al.: Molecular sexing of endangered cranes based on CHD-W gene. *J. App. Anim. Res.*, 2011. 39. 212–217.
34. MENDENHALL, C. D. – SEKERCIOGLU, C. H. – BRENES, F. O.: Using interpubic distance for sexing manakins in the field. *J. Field Ornithol.*, 2010. 81. 49–63.
35. MILLS, L. S. – CITTA, J. J. et al.: Estimating animal abundance using noninvasive DNA sampling: promise and pitfalls. *Ecol. App.*, 2000. 10. 283–294.
36. MORINHA, F. – CABRAL, J. A. – BASTOS, E.: Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*, 2012. 78 703–714.
37. MURPHY, M. T.: A cautionary tale : cryptic sexual size dimorphism in a socially monogamous Passerine. *Auk*, 2007. 124. 515–525.
38. PIENKOWSKI, M. W. – MINTON, C. D. T.: Wing length changes of the Knot with age and time since moult. *Bird Study.*, 1973. 20. 63–68.
39. RICHNER, H.: Avian laparoscopy as a field technique for sexing birds and an assessment of its effects on wild birds. *J. Field Ornithol.*, 1989. 60. 137–142.
40. SUH, A. – KRIEGS, J. O. et al.: Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 2011. 28. 2993–2997.
41. SVENSSON, L. *Identification Guide to European Passerines.* 1992.
42. TABERLET, P. – WAITS, L. P. – LUIKART, G.: Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.*, 1999. 14. 323–327.
43. TSUDA, Y. – NISHIDA-UMEHARA, C. et al.: Comparison of the Z and W sex chromosomal architectures in elegant crested tinamou (*Eudromia elegans*) and ostrich (*Struthio camelus*) and the process of sex chromosome differentiation in palaeognathous birds. *Chromosoma*, 2007. 116. 159–173.
44. VILI, N. – NEMESHÁZI, E. – KOVÁCS, SZ. – HORVÁTH, M. – KALMÁR, L. – SZABÓ, K.: Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling. *J. Ornithol.*, 2013. 154. 587–595.
45. VUCICEVIC, M. – STEVANOV-PAVLOVIC, M. et al.: Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biol.*, 2013. 32. 269–276.
46. WEIGMANN, H. D.: Reduction of disulfide bonds in keratin with 1 - 4-dithiothreitol I. Kinetic investigation. *J. Polymer Sci. Part A.*, 1968. 1. 2237–2253.

Közlésre érke.: 2017. máj. 25.