

Piume del sottocoda idonee al sessaggio molecolare

## Analisi **Determinazione del sesso negli uccelli: il sessaggio molecolare da piuma**

*testo e foto del dott. Arturo Corona*

La determinazione del sesso negli uccelli riveste un particolare interesse sia in campo naturalistico, per la conservazione delle specie selvatiche, sia tra gli allevatori per massimizzare la riproduzione in tutte quelle specie che non presentano dimorfismo sessuale evidente, in particolar modo nei Passeriformi e negli Psittaciformi. Non è sempre possibile, infatti, determinare il sesso degli uccelli alla sola ispezione visiva, soprattutto quando si tratta di soggetti giovani. In particolare, per quanto riguarda i caratteri sessuali, le varie specie di uccelli possono essere raggruppate in tre categorie: le specie che mostrano un precoce dimorfismo (questo è determinato dai colori del piumaggio nei soggetti molto giovani, come ad esempio nell' Ecletto o nel Parrocchetto dal groppone rosso); le specie che presentano dimorfismo, ma solo dopo aver raggiunto la maturità sessuale, tendenzialmente dopo circa 2-3 anni di età (come nel Parrocchetto dal collare e nel Parrocchetto reale); le specie che non presentano differenze tra i due sessi nell'intero arco della propria vita. In quest'ultimo caso, se è vero che maschio e femmina potrebbero presentare comportamenti diversi, il riconoscimento non ambiguo in cattività di tali segni distintivi rimane molto difficile, come frequentemente riportato per i Cacatua, le Amazzoni, i Cenerini. Per la determinazione del sesso è quindi spesso indispensabile ricorrere a procedure specifiche: il sessaggio chirurgico o il sessaggio molecolare. Il sessaggio chirurgico viene effettuato mediante endoscopia delle gonadi. Tale procedura deve essere eseguita da personale veterinario specializzato e, oltre alla determinazione del sesso, ha il vantaggio di poter valutare le condizioni di integrità e di sviluppo degli organi sessuali. Il sessaggio endoscopico è però un vero e proprio intervento chirurgico, che necessita di anestesia totale, esponendo l'uccello a rischi e stress.

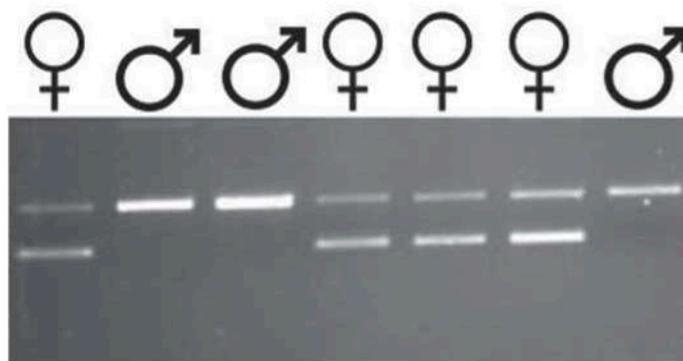
Il sessaggio molecolare, invece, è un metodo per nulla invasivo che viene eseguito in laboratorio da personale competente nelle tecniche di biologia molecolare, a partire dal DNA estratto da piume, generalmente quelle del sottocoda, che possono essere prelevate direttamente dall'allevatore.

In questo articolo descriverò nel dettaglio la tecnica del sessaggio molecolare tramite amplificazione di geni presenti sui cromosomi sessuali.

Come per l'uomo, anche negli uccelli l'assetto dei cromosomi sessuali, che prendono il nome di Z e W, è diverso tra maschio e femmina. Negli uccelli, il sesso eterogametico è rappresentato dai cromosomi femminili ZW, mentre quello omogametico dai cromosomi maschili ZZ. Un assetto che è quindi l'esatto contrario di ciò che accade a livello umano, dove XX (omogametico) è presente nella femmina e XY (eterogametico) è presente nel maschio.

Le tecniche molecolari per l'identificazione del sesso negli uccelli sono state rivoluzionate dalla descrizione, nel 1995, del primo gene situato sul cromosoma W, noto come CHD (*chromo-helicase-DNA-binding*). Poco tempo dopo, è stata trovata una copia strettamente correlata dello stesso gene anche nel cromosoma Z. I geni codificanti proteine sono ottimi indicatori per l'identificazione del sesso, in quanto sono fatti di DNA funzionale che si evolve molto lentamente ed è quindi alta la probabilità che tali porzioni genetiche siano condivise tra i diversi generi. Solo pochi geni codificanti sono stati localizzati sul cromosoma W e,

La banda singola indica i soggetti di sesso maschile, mentre quella doppia, indica quelli di sesso femminile



tra questi, il gene CHD è altamente conservato tra le diverse specie sia sul cromosoma W che su Z. Per questo motivo, ad oggi, l'amplificazione di una porzione del gene CHD è considerata la tecnica più rapida, economica, affidabile e di applicazione quasi universale per il sessaggio molecolare.

Le piume idonee ad essere analizzate sono quelle del sottocoda. Per il prelievo delle piume, è consigliabile effettuare un tiraggio netto e deciso, prestando attenzione a maneggiare le piume dall'estremità, onde evitare di toccare e, quindi, rischiare di contaminare il calamo, che è la parte della piuma da cui verrà effettuata l'estrazione del DNA e quindi il sessaggio. Si raccomanda, per questo motivo, l'utilizzo di guanti in lattice o comunque di avere le mani ben lavate. Le piume, infine, dovranno essere riposte in provette o bustine sigillate, correttamente etichettate con i dati di ogni individuo, per poi essere inviate in laboratorio. A dispetto di quanto si possa pensare, è stato riscontrato che il DNA presente nelle piume ha una buona stabilità, pertanto i campioni possono essere conservati anche per più giorni (anche una settimana) dopo aver effettuato il prelievo della piuma.

Il sessaggio molecolare in laboratorio, inizia con la catalogazione dei vari campioni. Si procede, poi, alla tecnica molecolare, che sottopone i calami recisi da ogni piuma ad alte temperature; ciò permetterà la rottura delle cellule e quindi la fuoriuscita del DNA. Il DNA estratto viene poi amplificato attraverso un processo detto PCR (reazione a catena della polimerasi). I frammenti di DNA amplificati devono essere analizzati tramite una procedura di elettroforesi. Questo processo consiste nel caricare i campioni di DNA in un gel di agarosio che, sottoposto a corrente elettrica, fungerà da filtro per il passaggio delle molecole di DNA, le quali, essendo cariche negativamente, migreranno verso il polo positivo in base alla propria lunghezza. Una volta ultimata la migrazione, i campioni verranno esposti ai raggi UV, che permetteranno di visualizzare delle bande che corrispondono ai frammenti amplificati. Nei soggetti di sesso femminile dovranno essere presenti due bande (una per il cromosoma W e l'altro per il cromosoma Z), mentre nei soggetti di sesso maschile dovrà essere presente una sola banda (solo per il cromosoma Z).

Prelievo delle piume dal sottocoda



Una non corretta interpretazione del risultato può derivare da assenza di DNA o contaminazione del campione di partenza, oppure ancora dall'uso di reagenti non idonei in laboratorio. Infatti, non tutti i campioni possono essere analizzati allo stesso modo, ma si dovrà fare attenzione alla specie di appartenenza. Per raggruppamenti di specie diverse, per ottimizzare l'amplificazione dei geni sessuali dovranno essere usati reagenti e metodi diversi e specifici. In tale processo è quindi molto importante l'abilità e l'esperienza dell'operatore nel determinare le migliori condizioni di analisi e nell'interpretazione dei risultati. Ad esempio, una significativa eccezione è rappresentata dai ratiti, cioè gli struzzi, che possiedono

cromosomi sessuali W e Z che sono molto meno differenziati tra di loro e che, per tale motivo, non possono essere sessati tramite analisi del gene CHD. Da qualche anno è comunque possibile determinare il sesso da piuma anche negli struzzi grazie alla scoperta di nuove sequenze di DNA presenti in maniera differenziale nei cromosomi sessuali.

Concludendo, posso affermare che il sessaggio molecolare si rivela una metodica efficace per tutte le specie in cui è assente dimorfismo sessuale, nelle quali, appunto, i soggetti di sesso maschile e quelli di sesso femminile risultano fenotipicamente identici. Inoltre, tale procedura è necessaria anche in tutte quelle specie che, pur avendo dimorfismo

sessuale, presentano in giovane età il medesimo fenotipo, che negli Psittaciformi in genere cambia in maniera definitiva solo attorno al terzo anno di età, abbreviando di gran lunga il tempo di formazione delle coppie, essenziale per ogni allevatore. Il sessaggio molecolare presenta, nelle giuste mani, un'affidabilità intorno al 100%, ma soprattutto risulta essere non invasivo per gli uccelli e molto pratico per l'allevatore. Generalmente, usufruiscono di questa tecnica gli allevatori di pappagalli, ma negli ultimi anni c'è stato un incremento della richiesta anche da parte di allevatori di uccelli esotici e canarini (in particolar modo allevatori di AGI e CREST)