

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Darja MAKOVEC

**DOLOČANJE POVEZAV MED ZUNANJIMI
LASTNOSTMI VALILNIH JAJC IN SPOLOM
PIŠČANCEV**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Darja MAKOVEC

**DOLOČANJE POVEZAV MED ZUNANJIMI LASTNOSTMI
VALILNIH JAJC IN SPOLOM PIŠČANCEV**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**DETERMINATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN
EXTERNAL CHARACTERISTICS OF HATCHING EGGS AND SEX
OF CHICKS**

B. SC. THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek visokošolskega strokovnega študijskega programa Kmetijstvo – zootehniko. Opravljeno je bilo na Katedri za znanosti o rejah živali Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Dušana Terčiča.

Recezent: doc. dr. Vida REZAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Dušan TERČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Vida REZAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum predavitve: 14. sep. 2016

Podpisana Darja Makovec izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Darja MAKOVEC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Vs
DK	UDK 636.5(043.2)=163.6
KG	perutninarstvo/valilna jajca/morfološke lastnosti/piščanci/spol/napovedovanje
KK	AGRI L10/6100
AV	MAKOVEC, Darja
SA	TERČIČ, Dušan (mentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2016
IN	DOLOČANJE POVEZAV MED ZUNANJIMI LASTNOSTMI VALILNIH JAJC IN SPOLOM PIŠČANCEV
TD	Diplomsko delo (visokošolski študij)
OP	X, 48 str., 9 preg., 11 sl., 76 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V perutninarstvu je selekcija usmerjena v prirejo jajc ali mesa. Ker petelinčki lahkega (nesnega tipa) za pitanje niso primerni, se jih v valilnicah kmalu po izvalitvi po navadi usmrti. Ta postopek sproža obsodbe in zgražanja posameznikov in društev za zaščito živali. Valjenje le ženskih živali lahkega tipa je zato ena od prioritet v perutninarstvu. V naši raziskavi nas je zanimala morebitna povezava med morfološki lastnostmi valilnih jajc in spolom piščancev. V poskusu smo uporabili 1497 valilnih jajc dveh križank slovenskega porekla (Prelux-G in Prelux-Č). Pred vlaganjem v valilnik smo jih 1, 3, 5, 6 in 8 dni skladiščili v prostoru s temperaturo 15°C in 75 % relativno vlago. Po skladiščenju smo jih individualno stehali in jim izmerili širino, višino ter barvo lupine. Vsakemu jajcu smo izračunali indeks oblike, prostornino in površino. Po izvalitvi smo piščancem določili spol po hitrosti operjanja (Prelux-G) in barvi puha (Prelux-Č). Podatke smo obdelali po modelu multivariatne logistične regresije. Zunanje lastnosti jajc niso izkazovale statistično značilnega ($p > 0,05$) vpliva na spol izvaljenih piščancev. Rezultati študije kažejo, da zunanji lastnosti valilnih jajc ni mogoče uporabiti kot kazalnike v napovedovanju spola piščancev pri križankah Prelux-G in Prelux-Č.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 636.5(043.2)=163.6
CX poultrybreeding/hatching eggs/morphological characteristics/chicks/sex/indication
CC AGRIS L10/6100
AU MAKOVEC, Darja
AA TERČIČ, Dušan (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2016
TI DETERMINATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN EXTERNAL CHARACTERISTICS OF HATCHING EGGS AND SEX OF CHICKS
DT Graduation thesis (Higher professional studies)
NO X, 48 p., 9 tab., 11 fig., 76 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Genetic selection in poultry industry is focused either on egg or meat production. As male birds of the laying strain are not suitable for meat production they are generally killed soon after they hatch. The killing of day-old male chicks has raised concerns in animal rights and animal welfare advocates. Therefore, the hatch of only female chicks is a high priority of the poultry industry. The aim of this research was to establish a connection between morphological characteristics of hatching eggs and sex of newly hatched chicks. A total of 1497 hatching eggs of two Slovenian hybrid layers (Prelux-G and Prelux-Č) were incubated and sexed in the end of incubation period. Before incubation eggs were stored for 1, 3, 5, 6 and 8 days in a storage room at 15°C and 75 % relative humidity. Thereafter they were individually weighed and width, length and shell colour were recorded. Shape index, volume and surface area were calculated for each egg. After hatch chicks were sexed by two methods: feather sexing (Prelux-G) and colour sexing (Prelux-Č). The multivariate logistic regression analysis was used for statistical analyses. The effects of all external egg characteristics had nonsignificant ($p>0.05$) effect on the sex of hatching chick. The results of our research suggested that exterior egg quality traits are not an indicator of sex of the Prelux-G and Prelux-Č hatching chicks.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
SLOVARČEK.....	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KARIOTIP KOKOŠI	3
2.2 TEORIJA O RAZPOREDITVI (ALOKACIJI) SPOLOV IN ODKLON V RAZMERJU MED SPOLOMA.....	4
2.3 DETERMINACIJA IN DIFERENCIACIJA SPOLA PRI PTICAH	5
2.3.1 Celično avtonomna določitev spola pri pticah	6
2.3.2 Gen DMRT1 in diferenciacija mod (testisov)	9
2.3.3 Ohranitev poti, ki določajo jajčnik pri pticah	10
2.4 METODE DOLOČANJA SPOLA PIŠČANCEV PRED IN PO VALJENJU KOKOŠJIH JAJC.....	11
2.4.1 Idealni kriteriji za določanje spola <i>in ovo</i>	11
2.4.2 Ročne in instrumentalne metode seksiranja en dan starih piščancev	11
2.4.2.1 Seksiranje po kloaki (japonska metoda).....	11
2.4.2.2 Seksiranje po hitrosti operjanja (zgodnje in pozno operjanje)	12
2.4.2.3 Seksiranje po barvi puha	13
2.4.2.4 Seksiranje po številu lusk na nogah	14
2.4.2.5 Ultrazvočna preiskava en dan starih piščancev	14
2.4.2.6 Laparoskopija (kirurško seksiranje)	14
2.4.3 Inkubirana jajca: citogenetske in hormonske tehnike.....	15
2.4.3.1 Analize steroidnih hormonov v blatu	15

2.4.3.2	Analize steroidnih hormonov v jajcih	15
2.4.3.3	Določitev kariotipa	15
2.4.3.4	Ultrazvok <i>in ovo</i>	16
2.4.3.5	Srčni utrip zarodka	16
2.4.3.6	DNK tehnike.....	16
2.4.3.7	CHD geni.....	18
2.4.4	Neinkubirana jajca.....	19
2.4.4.1	Iskanje spolno vezanih genov v blastodermalnih celicah neinkubiranih jajc	19
2.4.4.2	Določanje spola na osnovi oblike jajca	20
2.4.5	Vplivi okoljskih dejavnikov na spol pri pticah.....	21
2.4.5.1	Spreminjanje temperature med valjenjem	21
2.4.5.2	Obsevanje valilnih jajc z X žarki	21
2.5	MOŽNE ALTERNATIVE USMRTITVAM PETELINČKOV LAHKEGA TIPA	21
3	MATERIALI IN METODE DELA.....	23
3.1	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	27
4.1	OSNOVNA STATISTIKA	27
4.2	MULTIVARIATNA LOGISTIČNA REGRESIJA	33
4.3	KORELACIJA IN REGRESIJA	36
5	SKLEPI	38
6	POVZETEK.....	39
7	VIRI	41
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti en dan starih valilnih jajc pri dveh križankah kokoši.....	27
Preglednica 2: Osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti tri dni starih valilnih jajc pri dveh križankah kokoši.....	28
Preglednica 3: Osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti pet dni starih valilnih jajc pri dveh križankah kokoši.....	29
Preglednica 4: Osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti šest dni starih valilnih jajc pri dveh križankah kokoši.....	30
Preglednica 5: Osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti osem dni starih valilnih jajc pri dveh križankah kokoši	31
Preglednica 6: Število piščancev izvaljenih iz različno starih valilnih jajc križank Prelux-Č in Prelux-G.....	32
Preglednica 7: Multivariatna logistična regresija: vpliv zunanjih lastnosti jajc, križanke in starosti jajc ter njune interakcije na spol piščanca	33
Preglednica 8: Korelacija med maso jajc ob vlaganju v valilnik in maso izvaljenih piščancev (Pearsonov koeficient korelacije).....	37
Preglednica 9: Enačbi za napoved mase izvaljenega piščanca na osnovi mase valilnega jajca pri križankah Prelux-Č in Prelux-G.....	37

KAZALO SLIK

Slika 1:	Genetski mehanizem determinacije spola pri pticah (prirejeno po Sex linkage, 2015)	3
Slika 2:	Spolni kromosomi pri sesalcih in pticah (prirejeno po Chue in Smith, 2011).....	6
Slika 3:	Ginandromorfna kokoš (prirejeno po: Zhao in sod., 2010)	7
Slika 4:	Determinacija spola in spolna diferenciacija pri kokoših (Chue in Smith, 2011)	9
Slika 5:	Seksiranje piščancev po japonski metodi (How to sex chicken, 2016).....	12
Slika 6:	Seksiranje po hitrosti operjanja (levo - pozna operjenost, desno - zgodnja operjenost) (Gershman, 2014).....	13
Slika 7:	Seksiranje piščancev po barvi puha (Dominant Brown D 102, 2016 – levo in Dominant Black D 109, 2016 - desno)	13
Slika 8:	Določitev spola pri papigah nimfah s tehniko pomnoževanja genov CHD v reakciji PCR (Cerit in Avanus, 2007)	19
Slika 9:	Celice blastoderma na rumenjaku (Question about eggs.. PIC, 2008)	20
Slika 10:	Shemi parjenj za pridobivanje križank Prelux-G (levo) in Prelux-Č (desno) (Terčič D., 2015).....	23
Slika 11:	Piščanci ob izvalitvi v lesah izvalilnika (foto: D. Makovec)	25

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp – bazni par

CHD – gen za kromo-helikaza-DNK-vezavni protein

CHD-W – CHD gen na spolnem kromosomu W

CHD-Z – CHD gen na spolnem kromosomu Z

DMRT1 - angl. Double-sex and Mab-3 Related Transcription Factor #1

DNK – deoksiribonukleinska kislina

kb – kilobazni par

PCR – verižna reakcija s polimerazo

µm – mikrometer

SLOVARČEK

Evkromatin: del kromosoma, aktiven v izražanju genov; ni zavrt v času interfaze, se pa kondenzira v mitози; najbolj kondenziran je v metafazi.

Ginandromorfen organizem (grško »gyne« = samica; »andro« = samec): organizem z moškimi in ženskimi lastnostmi, ki ima lahko bilateralno asimetrijo (na eni strani samec, na drugi samica) ali je mozaicističen, ko prisotnih moških in ženskih celic v istem organizmu medsebojno ne moremo jasno ločiti.

Heterokromatin (grško »heteros« = različen; »chroma«=barva): v celotnem celičnem ciklu zelo kondenziran del kromosoma, neaktiven pri izražanju genov, vendar lahko sodeluje pri kontroli metabolnih aktivnosti, prepisovanju in celični delitvi.

Kandidatni gen: gen, ki bi lahko potencialno vplival na lastnost, čeprav v študijah vzročna povezava med genom in izraženostjo proučevane lastnosti še ni bila potrjena.

Seksiranje: ločevanje mladičev perutnine po spolu.

1 UVOD

Pri kokoših se samci (petelinčki) in samice (jarčke) valijo v približnem razmerju 50 : 50. Ko so rejci redili živali obeh spolov, kokoši za prirejo jajc in peteline za prirejo mesa, to dejstvo ni bilo posebej pomembno. Za ljubiteljske rejce in rejce okrasnih pasem razmerje med spoloma še danes ni posebej pomembno. Problem s petelinčki iz lahkih (nesnih) linij kokoši se je v komercialni praksi pojavil pred približno šestdesetimi leti, ko se je genetska selekcija usmerila bodisi v prirejo jajc bodisi v prirejo mesa (Chambers, 1990). Pitovne piščance (brojlerje) pitamo večinoma mešano po spolu, zaradi česar jih ni potrebno ločevati po spolu (seksirati). Na drugi strani imamo plemenske jate za težki tip kokoši in pur, kjer med spoloma obstaja precejšnja razlika v telesni masi, zato je pri njih seksiranje nujna. Petelinčki lahkih linij rastejo počasi, potrebujejo velike količine krme in so slabo omišičeni (Chambers, 1990; Damme in Ristić, 2003). Ker torej za pitanje niso primerni, petelinčkov križancev lahkega tipa ne potrebujemo in jih bodisi predelamo v kafilerijah v beljakovinsko bogato surovino ali uporabimo v prehrani mesojedih ptic, plazilcev, sesalcev in rib (Kaleta in Redmann, 2008). Prezgodnji zaključek življenja dan starih petelinčkov lahkega tipa vzbuja skrb in zgražanje posameznikov in društev za zaščito živali, ki zahtevajo, da se tej praksi naredi konec. Izključno valjenje jajc, ki vsebujejo le zarodke ženskega spola, bi bilo koristno tudi z okoljskega vidika (manj potrebne energije in drugih vložkov), obenem pa bi se zaradi zmanjšanja stroškov, povezanih z valjenjem povečala proizvodna učinkovitost valilnic. Zato je valjenje le ženskih živali lahkega tipa ena od prioritet, ki je v perutninarstvu postavljena dokaj visoko (Kaleta in Redmann, 2008). V preteklosti je bilo vloženega veliko npora za določitev spola valilnih jajc pred njihovim vlaganjem v valilnike ter v določitev spola zarodkov v zelo zgodnjih fazah embrionalnega razvoja. Obstaja veliko metod, po katerih lahko določimo spol en dan starim piščancem: ločevanje po spolnih znakih na kloaki, ločevanje po dolžini tulcev perutnih peres, ločevanje po barvi puha, ločevanje po številu kožnih lusk na prstih ter ločevanje z uporabo ultrazvoka. Poleg tega lahko v jajcih v času valjenja izmerimo razmerje med estrogenom in androgenom, opravimo citogenetsko analizo kromosomov, uporabimo ultrazvok *in ovo*, merimo srčni utrip zarodkov ter spremljamo vpliv temperature valjenja na spol izvaljenih piščancev (Kaleta in Redmann, 2008).

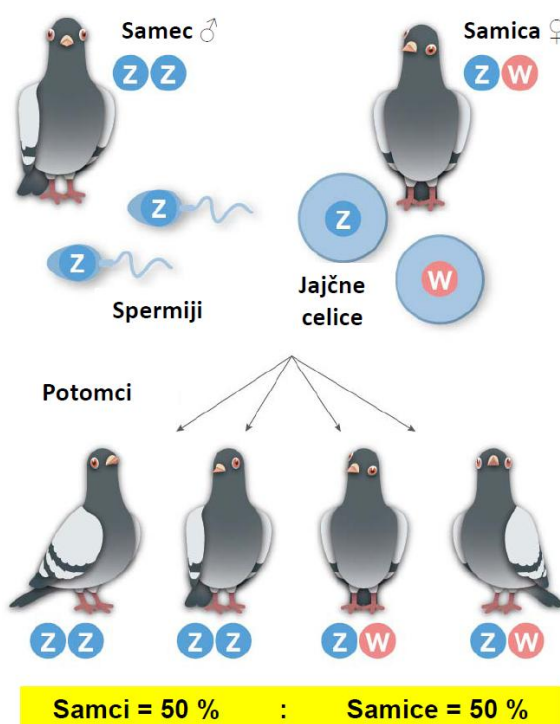
Slabost v predhodnem stavku omenjenih metod je ta, da so delovno zelo zahtevne ter niti primerne niti praktične za komercialno uporabo. Zaradi navedenega bi bila morebitna povezava med morfološkimi lastnostmi valilnih jajc in spolom piščancev za komercialno prakso veliko bolj praktična, predvsem pa ne bi zahtevala uničevanja zarodkov oziroma en dan starih piščancev neželenega spola. Le malo je raziskav, v katerih so raziskovalci proučevali povezavo med zunanjimi lastnostmi valilnih jajc in spolom izvaljenih piščancev pri kokoših. Poleg morfoloških lastnosti jajc lahko na razmerje med spoloma izvaljenih piščancev vplivata še genotip in starost živali. Zato smo v naši raziskavi skušali opredeliti morfološke lastnosti valilnih jajc pri križankah slovenske provenience Prelux-G (grahasta

nesnica) in Prelux-Č (črna nesnica) in ugotoviti morebitno povezavo teh lastnosti s spolom izvaljenih križancev. Povezave smo ugotavljali pri dveh različnih starostih matičnih jat za omenjeni križanki.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KARIOTIP KOKOŠI

Kariotip predstavlja opis števila, velikosti in oblike vseh kromosomov neke celice oz. organizma. Kariotip kokoši sestavlja 78 kromosomov; od tega je 38 parov nespolnih (avtosomalnih) kromosomov in 1 par spolnih kromosomov. Vseh 39 parov kromosomov, ki sestavljajo kariotip kokoši, delimo na osem velikih, citogenetsko ločljivih makrokromosomov, dva spolna kromosoma (Z in W) ter 30 parov majhnih, citogenetsko neločljivih mikrokromosomov. Po ocenah znanstvenikov mikrokromosomi predstavljajo okrog 30 % genoma in nosijo okrog 25 do 40 % vseh genov (Kerje, 2003). Kokoši spadajo v razred ptic (*lat. Aves*). Tako kot pri večini ostalih vretenčarjev tudi pri pticah spol določajo spolni kromosomi, ki so najverjetneje nastali s postopno evolucijo iz avtosomalnih kromosomov nekega skupnega prednika vretenčarjev (Ellegren, 2000). Za razliko od sesalcev, kjer so samci heterogametni (XY) in samice homogametne (XX), so pri pticah samice heterogametne (ZW) in samci homogametni (ZZ) (slika 1). Spolni kromosom W je znatno manjši od spolnega kromosoma Z, nosi malo genov in je bogat s konstitutivnim heterokromatinom in ponavljajočimi zaporedji DNK (Griffiths in sod., 1996).



Slika 1: Genetski mehanizem determinacije spola pri pticah (prirejeno po Sex linkage, 2015)

2.2 TEORIJA O RAZPOREDITVI (ALOKACIJI) SPOLOV IN ODKLON V RAZMERJU MED SPOLOMA

Že Charlesu Darwinu (1809-1882) je zbudilo veliko zanimanje opažanje, da se v populacijah različnih vrst živali skozi generacije ohranja skoraj enako razmerje med spoloma (50:50) (Darwin, 1871 cit. po Aslam, 2014). Po obdobju, ko je deloval Darwin, teorija o razporeditvi spolov ni bila deležna večjega zanimanja vse do leta 1930, ko je Fisher pojasnil način, po katerem naravna selekcija privede do enakega razmerja med spoloma (Fisher, 1930 cit. po Aslam, 2014). Ko je v neki populaciji razmerje med spoloma porušeno, ima po Fisherju tista mati, ki ima največjo reprodukcijsko učinkovitost v produkciji redkeje zastopanega spola, tudi največji reprodukcijski fitnes in njeno potomstvo ima največjo preživitveno sposobnost. To privede do povečanja pogostosti redkeje zastopanega spola in posledično do populacijskega ravnotežja v relativnem razmerju med spoloma. V nadaljevanju je Hamilton (1967, cit. po Aslam, 2014) z uporabo matematičnega modeliranja ter empiričnih testiranj bolj podrobno raziskal in potrdil Fisherjevo teorijo o razporeditvi spolov. Nekateri raziskovalci so navedeno teorijo nadgradili z ugotovitvijo, da lahko v določenih okoliščinah razmerje med spoloma odstopa od enakosti, kar ima lahko selektivno prednost (Trivers in Willard, 1973, Charnov, 1982, vsi cit. po Aslam, 2014). Teorija o razporeditvi spolov med drugim pravi, da bodo matere v primerih, ko se stroški reje sinov razlikujejo od stroškov reje hčera, in ko preživetje oziroma reprodukcijski potencial enega spola variira v odvisnosti od starševskih sposobnosti, ki se prenesejo na potomce, izvalile več piščancev tistega spola, ki v danih razmerah prinaša več koristi (Trivers in Willard, 1973, Charnov, 1982, vsi cit. po Aslam, 2014). Pri velikem številu taksonov (npr. pri sesalcih, plazilcih, pticah) obstajajo eksperimentalni dokazi o tem, da lahko v odvisnosti od okoljskih pogojev ter vpliva staršev prihaja do odklonov v razmerju med spoloma, kar je v skladu s koncepti teorije o razporeditvi spolov. Niso pa popolnoma pojasnjeni mehanizmi, ki privedejo do odklonov. Ko je govora o odklonu v razmerju med spoloma, je pomembno razlikovati med primarnim in sekundarnim razmerjem med spoloma (Aslam, 2014). Primarno razmerje med spoloma izhaja iz determinacije spola v času mejoze oziroma oploditve jajčne celice, medtem ko se sekundarno razmerje oblikuje v kasnejših fazah, zelo pogosto ob rojstvu oziroma pri pticah ob izvalitvi.

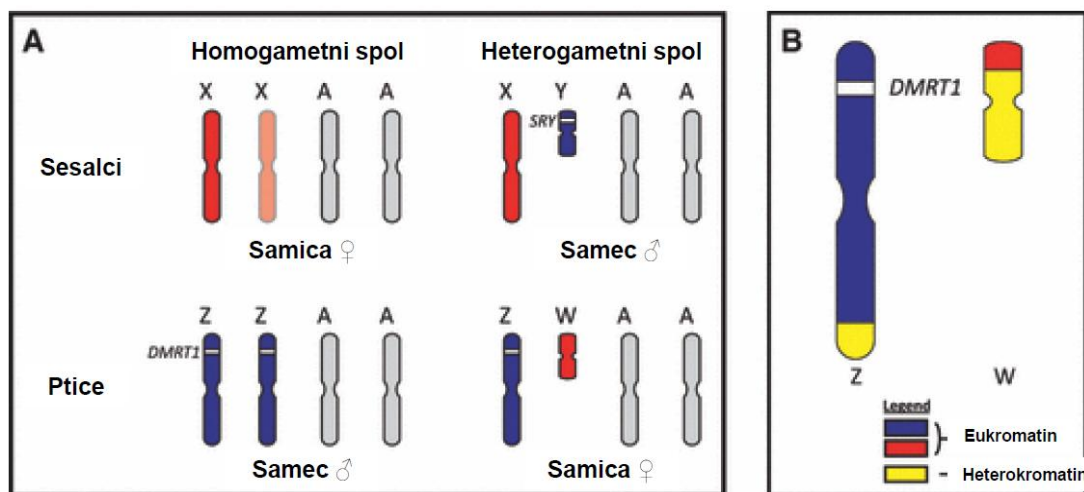
Razlikovanje primarnega in sekundarnega razmerja je pomembno zaradi različnih mehanizmov, ki vplivajo na enega oziroma drugega. Sekundarno razmerje se lahko razlikuje od primarnega zaradi različne preživitvene sposobnosti oocit oziroma zarodkov (v odvisnosti od njihovega spola) kot tudi zaradi različne preživitvene sposobnosti mladičev posameznega spola v postnatalni fazi razvoja (Alvarez, 2006). Primarno razmerje je biološko učinkovitejše, saj predstavlja stroškovno najučinkovitejši način, da samica producira večje število potomcev zelenega spola. Zato bi bila v perutninarstvu to prav gotovo najboljša pot za porušitev razmerja med spoloma v korist valjenja večjega števila

jarčk lahkega tipa. Težava je v tem, da nam za razliko od mehanizmov, ki določajo sekundarno razmerje med spoloma mehanizmi, ki določajo primarno razmerje, niso poznani (Li in sod., 2008). Obstaja veliko razlogov, zaradi katerih bi bilo dobro poznati mehanizme, ki vplivajo na primarno razmerje. Prvič, odpirla bi se pot za številčno uravnavanje posameznega spola v želeni smeri. Pri lahkem tipu kokoši bi lahko spodbudili valjenje večjega števila jarčk, ne da bi pri tem prizadeli zdravje, počutje in proizvodnost živali. Na ta način bi omejili število odvečnih petelinčkov, ki jih moramo v valilnicah usmrtiti (Kaleta in Redmann, 2008). Drugič, poznavanje mehanizmov, ki določajo primarno razmerje med spoloma, bi lahko bilo koristno uporabljeno v programih ohranjanja posameznih genskih virov. In tretjič, razumevanje teh mehanizmov pri pticah bi pripomoglo k razumevanju evolucijskih in funkcionalnih posledic odklona v razmerju med spoloma (Aslam, 2014).

2.3 DETERMINACIJA IN DIFERENCIACIJA SPOLA PRI PTICAH

Determinacijo spola lahko opredelimo kot najzgodnejši dogodek, pri katerem je določen spol živali. Pri pticah in sesalcih je spol določen ob oploditvi s kombinacijo spolnih kromosomov. Diferenciacija spola se zgodi kasneje in vključuje spolno diferenciacijo spolnih žlez, pri čemer se razvijejo bodisi jajčniki ali moda (testisi) (Chue in Smith, 2011). Z vidika razvoja je determinacija spola zelo star proces, ki se navezuje na spolno razmnoževanje, le to pa je bilo ključna gonilna sila evolucije. Razvoj spolnega fenotipa, običajno samca ali samice, se v splošnem zgodi v času embrionalnega razvoja. Uravnavajo ga genetski dejavniki in hormonske aktivnosti.

Pri vretenčarjih spol opredeljujejo bodisi okoljski bodisi genetski dejavniki (Barske in Capel, 2008, Guiguen in sod., 2009, vsi cit. po Chue in Smith, 2011). Genetska determinacija spola je prisotna pri sesalcih in pticah. Obe omenjeni skupini imata definirane spolne kromosome. Spolni kromosomi ptic (ZZ/ZW) niso v nikakršni povezavi s spolnimi kromosomi sesalcev (XX/XY). To pomeni, da so se, ločeno po taksonih, razvili iz različnih parov avtosomalnih kromosomov. Zato pri pticah ni prisoten tako imenovani SYR gen, ki pri sesalcih (vrečarjih in živalih s placento-posteljico) določa testise (Chue in Smith, 2011) (slika 2).

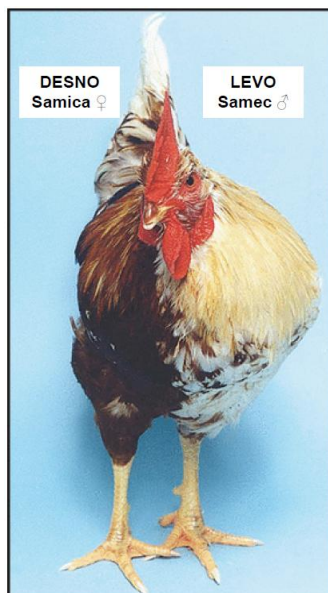


Slika 2: Spolni kromosomi pri sesalcih in pticah (prirejeno po Chue in Smith, 2011)

2.3.1 Celično avtonomna določitev spola pri pticah

Večina znanj o določitvi spola pri pticah je bila pridobljena v raziskavah na kokoših (*Gallus gallus domesticus*), ki so že dolgo časa pomemben model v razvojni biologiji. Popolno nukleotidno zaporedje kokošjega genoma je znano že kar nekaj let (Hillier in sod., 2004). Spol pri kokoših in ostalih pticah določa dedovanje spolnih kromosomov. Samci imajo spolna kromosoma ZZ, samice spolna kromosoma ZW. Kromosom Z je večji od kromosoma W in je nosilec gena z oznako DMRT1, ki določa razvoj testisov. Manjši kromosom W je nosilec manjšega števila genov in je pretežno heterokromatičen (Chue in Smith, 2011) (slika 2). Za gene, ki se nahajajo na enem ali obeh spolnih kromosomih, se domneva, da v času embrionalnega razvoja nadzirajo diferenciacijo spolnih žlez in v povezavi z njihovim delovanjem se pri samcih (ZZ) razvijejo moda (testisi) in pri samicah (ZW) jajčniki (ovariji) (Chue in Smith, 2011). Pri kokoših se morfološka diferenciacija gonad v testise oziroma ovarije dogaja v času od 6. do 21. dne embrionalnega razvoja. Pri samcih (ZZ) se v sredici spolne žleze diferencirajo Sertolijeve celice, medtem ko zunanja skorja regresira. Istočasno postane pri samicah (ZW) leva spolna žleza jajčnik z odebeljeno skorjo in vakuolami v sredici. Desna spolna žleza samice regresira (Chue in Smith, 2011). Mehanizem determinacije spola pri pticah se razlaga z dvema hipotezama: doziranjem genov na spolnem kromosomu Z oziroma z dominantnim kromosomom W. V skladu s prvo hipotezo spol določa doza enega ali več genov na spolnem kromosomu Z, pri čemer je za samce značilna večja doza. Druga hipoteza predpostavlja, da se na spolnem kromosomu W nahaja dominantno delujoča determinanta, ki pri samici sproži razvoj jajčnika (Ellegren, 2000; Smith in sod., 2007). Čeprav nobeden od omenjenih mehanizmov doslej še ni bil dokončno potrjen, večina dokazov govori v prid hipotezi o učinkovanju genov na spolnem kromosomu Z (Smith in sod., 2009). Tradicionalen pogled na spolni razvoj pri pticah in ostalih vretenčarjih pravi, da se v času embrionalnega razvoja spolne

žleze razvijejo v jajčnike ali moda in ti nato izločajo hormone, ki pogojujejo razvoj ženskih oziroma moških znakov. To trditev spodbkopavajo raziskave opravljene na ginandromorfnih pticah, ki nakazujejo, da je determinacija spola pri pticah celično avtonomna. Zhao in sod. (2010) so proučevali tri v naravi prisotne ginandromorfne kokoši, katerih fenotip je na eni strani telesa moški, na drugi pa ženski (slika 3).



Slika 3: Ginandromorfna kokoš (prirejeno po: Zhao in sod., 2010)

Na moški polovici so ugotovili močnejše izraženo prsno mišičnino, večje podbradke in ostrogo, medtem ko je imela ženska polovica manjšo količino mesa na področju prsi, ni imela podbradkov niti ostroge. Na moški polovici telesa so ugotovili predvsem celice ZZ, na ženski polovici telesa pa približno 50 % celic ZW. V ozadju omenjenega spolnega mozaicizma naj bi bil mehanizem, po katerem pri samicah v času mejoze ne pride do izločitve polarnega telesa, zaradi česar vsebuje oplojena jajčna celica ZZ in ZW pronukleuse. Posledično ima mozaični zarodek moške in ženske spolne celice. Ginandromorfov ni mogoče pojasniti s hormoni, za katere bi pričakovali, da potujejo enako po obeh straneh telesa. Zhao in sod. (2010) ugotavljajo, da so razlike v spolu med obema deloma telesa določene s spolnima kromosomoma v vsaki celici (celično avtonomne). S transplantacijo fluorescenčno označenih celic spolnih žlez enega spola v zgodnje spolne žleze istega ali nasprotnega spola (precej pred diferenciacijo spolnih žlez) so Zhao in sod. (2010) ugotovili, da vse celice »vedo« za svoj spol že zgodaj v razvoju. Ko so ta postopek izvedli pri transplantantih istega spola, je prišlo do integracije celic dajalca in gostitelja. Če so celice dajalca in gostitelja izvirale od nasprotnih spolov, do integracije ni prišlo (Zhao in sod., 2010). Podatki iz raziskave Zhaoja in sod. (2010) nudijo verodostojne dokaze o tem, da spol pri pticah določajo genetski dejavniki, ki delujejo v vsaki celici telesa. Zdi se, da ta proces vnaprej datira spolno diferenciacijo žlez in izločanje hormonov iz teh žlez. Možna alternativna razlaga za poskuse transplantacije tkiv bi bila, da nosijo celice enega spola na

svoji površini antigen, ki preprečuje integracijo s celicami nasprotnega spola, analogno s antigenom H-Y pri sesalcih (Wachtel, 1981 cit. po Chue in Smith, 2011). Dejansko se antigen H-W pojavlja pri samicah (ZW) (Wachtel in sod., 1983 cit. po Chue in Smith, 2011). Zdi se, da se ta za samice specifični antigen inducira z estrogenom na začetku diferenciacije spolnih žlez in se ne izraža v zgodnejših fazah (Koo in sod., 1985, Muller in sod., 1979, Ebensperger, 1988, vsi cit. po Chue in Smith, 2011). Zhao in sod. (2010) navajajo, da lahko zgodnje izražanje podobnega antigena, ki preprečuje integracijo tkiva nasprotnega spola, ne nastopa v povezavi s pozno diferenciacijo spolnih žlez oziroma je del celično avtonomnega procesa determinacije spola. Pojav somatskega spola pri pticah neodvisno od spolnih žlez potrjujejo tudi nekatere druge raziskave. Izražanje spolno dimorfnih genov se v zarodkih pojavi, še preden se spolne žleze diferencirajo v moda ali jajčnike, torej pred izločanjem spolno specifičnih hormonov (Smith in sod., 2007).

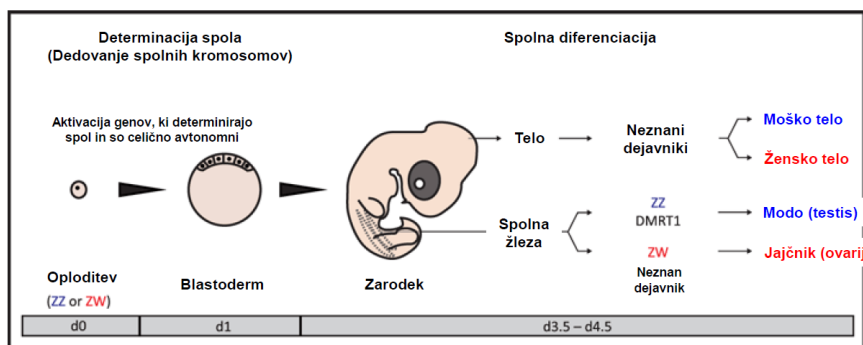
Transplantacijske raziskave na zarodkih prepelic so pokazale, da samci z možgani samic kažejo oblike obnašanj, ki so značilne za samice in ne za samce (Gahr, 2003 cit. po Chue in Smith, 2011). Avtorji ginandromorfnih raziskav ne izključujejo podporne vloge steroidnih hormonov, kot sta testosteron in estrogen. Hormoni prav gotovo igrajo določeno vlogo v zgodnjem razvoju spola. Kokošji zarodek, ki je genetsko samica, se bo namreč razvil v moškega z modi, če mu v zgodnji fazi razvoja (3.-4. dan) eksperimentalno blokiramo encim aromatazo, ki sodeluje pri sintezi estrogena (Smith in sod., 2003). Ta odkritja kažejo, da se pri pticah »determinacija spola« ne osredotoča zgolj na spolne žleze, temveč jo lahko opišemo kot genetski proces, ki se odvija v celotnem zarodku. O podobnih dognanjih poročajo tudi pri sesalcih. Tako gredo na primer primarne celične kulture hipotalamusa podgan in mišk skozi spolno diferenciacijo v pogojih *in vitro* pred začetkom spolno dimorfnih izločanj posameznih spolnih žlez (Reisert in Pilgrim, 1991, Pilgrim in Reisert, 1992, vsi cit. po Chue in Smith, 2011). Pri vrečarjih (sesalcih) diferenciacija vreče pri samicah ali mošnje pri samcih vnaprej datira diferenciacijo spolnih žlez in je odvisna od doziranja kromosoma X (Renfree in Short, 1988, Glickman in sod., 2005, vsi cit. po Chue in Smith, 2011). Avtorji ginandromorfne raziskave pri kokoših ugotavljajo, da je lahko doziranje genov, vezanih na Z kromosom, osnova za determinacijo spola po celem telesu ptic: samci (ZZ) imajo dve dozi vseh genov, vezanih na Z kromosom, medtem ko imajo samice (ZW) eno samo dozo. Potemtakem lahko »Z-transkriptom« prenese spolno identiteto na vsako celico v telesu (Zhao in sod., 2010). Velja poudariti, da pri pticah ne obstaja mehanizem kromosomske kompenzacije doze, kot se pojavlja na X kromosomu pri sesalcih (Itoh in sod., 2007). V povprečju imajo zato samci pri kokoših v primerjavi s samicami dvojno dozo večine genov, ki se nahajajo na Z kromosomu in to je lahko mehanizem, ki določa, ali se celica identificira kot moška ali kot ženska. V redu ptic, ki ne letajo (npr. noj, emu, nandu) sta si kromosoma Z in W skoraj identična in nosita skoraj isti niz genov, kar nedvomno oslabi verjetnost za mehanizem določitve spola, ki temelji na doziranju transkripta kromosoma Z (Chue in Smith, 2011). Če je spol določen celično avtonomno z enakim mehanizmom pri vseh pticah, se torej lahko opira na enega ali nekaj

specifičnih Z genov ali na dominanten gen na kromosomu W, ki je prisoten pri pticah, ki letajo kot tudi pri tistih, ki ne letajo.

Ne glede na to, ali je spol pri pticah celično avtonomen ali odvisen od hormonov, ključni geni uravnavajo razvoj embrionalnih spolnih žlez v jajčnike ali moda kot del procesa spolne diferenciacije. Eden od teh genov je DMRT1 (angl. Double-sex and Mab-3 Related Transcription Factor #1) (Chue in Smith, 2011).

2.3.2 Gen DMRT1 in diferenciacija mod (testisov)

Na kromosomu Z se pri kokoših nahaja preko 680 znanih genov, ki določajo proteine, 49 novih genov in vsaj 45 nekodirajočih RNA genov (Chicken, 2016). Vsak od teh genov bi lahko igral vlogo pri celično avtonomni determinaciji spola in/ali spolni diferenciaciji spolnih žlez. Kandidatni gen, ki se nahaja na kromosomu Z in nadzira spolno diferenciacijo spolnih žlez, je DMRT1. Ta gen je ohranjen med zarodki vretenčarjev in je bolj izražen v spolnih žlezah samcev kot samic, kar velja tako za piščančje zarodke kot tudi ostale taksone, kot so sesalci, plazilci in ribe (Smith in sod., 1999, Raymond in sod., 1999, Kim in sod., 2003, Murdock in Wibbels, 2003, vsi cit. po Chue in Smith, 2011). Pri pticah je gen DMRT1 prisoten na Z kromosomu, ni pa prisoten na W kromosomu. To velja za vse ptice – letalce in neletalce. Večina preostalih na Z kromosom vezanih genov ima pri neletalcih ortologe na W kromosomu. Večja doza in večji nivo izražanja v zarodkih samcev (ZZ) sprožita razvoj mod. Za razvoj jajčnika sta značilna manjša doza Z-ja in manjši nivo izražanja (Smith in Sinclair, 2004). Poskusno utišanje gena DMRT1 v zgodnji fazi razvoja piščančjih zarodkov privede do feminizacije moških spolnih žlez, kar vpliva na ustroj tkiv, izražanje genov in porazdelitev spolnih celic (Smith in sod., 2009). Te ugotovitve podpirajo hipotezo o doziranju Z pri determinaciji spola ptic ali vsaj pri spolnem razvoju spolnih žlez, kajti ZZ samci imajo večjo dozo gena DMRT1. Le ta inicira diferenciacijo mod in izražanje ključnega dejavnika (SOX9) za diferenciacijo Sertolijevih celic. Ali je na spolnem kromosomu Z vezani DMRT1 odgovoren za determinacijo spola pri pticah? Mogoče to velja za diferenciacijo spolnih žlez, ne pa za druga tkiva v telesu (Chue in Smith, 2011) (slika 4).



Slika 4: Determinacija spola in spolna diferenciacija pri kokoših (Chue in Smith, 2011)

V spolnih žlezah zarodka je večja doza DMRT1 potrebna za ustrezno oblikovanje mod in zato ima ta gen ključno vlogo v moških spolnih žlezah (Smith in sod., 2009). Vendar transplantacijski poskusi s celicami, ki so jih Zhao in sod. (2010) izvajali na dva dni starih zarodkih nakazujejo, da imajo prekursorske celice za spolne žleze spolno identiteto že pred nastankom spolnih žlez. DMRT1 je močneje izražen v moških in manj v ženskih urogenitalnih tkivih. Razlika nastopi okrog polčetrtega dneva starosti, torej precej pred spolno diferenciacijo spolnih žlez. Če se DMRT1 izraža celo prej, pri starosti zarodka dva dni, bi bil lahko odgovoren oziroma prispeva k spolni identiteti spolnih žlez pred morfološko diferenciacijo, do katere pride v šestem dnevu valjenja. Alternativno lahko še eden, na kromosom Z vezan gen ali na kromosom W vezan zaviralni dejavnik sodelujeta v procesu spolne diferenciacije spolnih žlez (Zhao in sod., 2010). Gen DMRT1 se ne izraža izven urogenitalnega sistema. Po drugi alternativni obstaja pri pticah dodaten (neznan) spolno vezan gen, ki determinira spol. V spolnih žlezah ta gen posredno ali neposredno vpliva na izražanje spolno dimorfne gena DMRT1 (Chue in Smith, 2011). Če je torej somatski spol celično avtonomen, je prisoten še dodaten spolno vezan gen. To je lahko katerikoli gen ali več genov iz skupine 600 genov, ki so že kartirani na kromosomu Z. Obstaja možnost, da na spol vpliva na spolni kromosom W vezan feminizirajoči dejavnik. Da bi identificirali spolno vezane mRNA, bi se morale prihodnje raziskave osredotočiti na profiliranje tkiv, ki ne pripadajo spolnim žlezam (npr. na možgane) (Chue in Smith, 2011).

2.3.3 Ohranitev poti, ki določajo jajčnik pri pticah

V skladu s hipotezo o dominanci W-ja, se na kromosomu W nahaja gen, ki določa jajčnik in s tem usmeri razvoj v samico. Gre za analogijo s sesalskim kromosomom Y, na katerem se nahaja gen SRY, ki pogojuje razvoj mod. Na spolnem kromosomu W, ki je heterokromatičen in v veliki meri sestavljen iz ponavljajočih se DNK zaporedij, ni bil kartiran še noben dober kandidatni gen (Itoh in sod., 2007). Nekateri na kromosom W vezani geni so bili identificirani in nekateri se izražajo v spolnih žlezah zarodka, vendar ne obstajajo dokazi o njihovi vlogi pri razvoju jajčnika (O'Neill in sod., 2000, Reed in Sinclair, 2002, vsi cit. po Chue in Smith, 2011). Yamada in sod. (2004) so izvedli podroben pregled izražanja na kromosom W vezanih genov, ki bi lahko bili aktivni v zgodnjem razvoju spolnih žlez, vendar niso izdvojili nobenega dobrega kandidata. Znano je, da ima gen FOXL2 določeno vlogo pri razvoju in ohranjanju jajčnika pri sesalcih. V kokošjem zarodku se omenjeni gen aktivira specifično za ženski spol tik pred spolno diferenciacijo spolnih žlez (Loffler in sod., 2003; Govoroun in sod., 2004 cit. po Chue in Smith, 2011). Raziskave kažejo, da v času razvoja jajčnika gen FOXL2 pri kokoših aktivira aromatazo.

2.4 METODE DOLOČANJA SPOLA PIŠČANCEV PRED IN PO VALJENJU KOKOŠJIH JAJC

2.4.1 Idealni kriteriji za določanje spola *in ovo*

Idealna *in ovo* metoda seksiranja križancev lahkega tipa bi morala izpolnjevati vsaj nekatere od naslednjih kriterijev (Kaleta in Redmann, 2008):

- metoda bi se morala izvajati na valilnih jajcih pred njihovim vlaganjem v valilnike;
- metoda ne sme vplivati na integriteto jajčne lupine in notranjost jajca;
- jajca, ki vsebujejo moške blastodermalne celice, je treba po določitvi spola koristno uporabiti;
- uporabljena metoda ne sme imeti negativnega vpliva na embrionalni razvoj piščanca;
- valilnost piščancev ne sme biti prizadeta;
- morebitna potrebna oprema za ločevanje mora biti na voljo, njena uporaba pa mora biti ekonomsko sprejemljiva;
- metodo je mogoče uporabiti na velikem številu valilnih jajc;
- ločevanje po spolu mora potekati hitro;
- metoda ne sme imeti negativnega vpliva na reprodukcijo samic in ne sme izkazovati negativnih vplivov na post-embrionalni fizični in psihični razvoj piščancev;
- metoda mora biti sprejemljiva s človeškega in etičnega vidika.

2.4.2 Ročne in instrumentalne metode seksiranja *en dan starih piščancev*

Obstaja več metod za določitev spola novo izvaljenih piščancev z različno praktično uporabnostjo. Te metode vključujejo ločevanje po operjenosti in po spolnih znakih na kloaki. Obstaja nekaj spolno vezanih genov, ki so deloma povezani s fenotipskimi lastnostmi, vendar se te lastnosti občasno ne izrazijo v popolnosti, zaradi česar niso zanesljivi morfološki označevalci za določitev spola (Smyth, 1990).

2.4.2.1 Seksiranje po kloaki (japonska metoda)

To tehniko sta prva opisala japonska znanstvenika Masui in Hashimoto leta 1933, zato je znana tudi pod imenom japonska metoda določanja spola. Spol se določi z vizualizacijo notranjosti kloake. Pri piščancih moškega spola je prisoten zakrnel falus v obliki stožčaste izbokline na trebušni strani kloake tik pod odprtino debelega črevesa. Pri piščancih ženskega spola (jarčkah) je na tej lokaciji prisotna samo majhna, polobli podobna struktura (Kaleta in Redmann, 2008). Japonska metoda ločevanja zahteva od sekserja veliko izkušenj in spretnosti. V Aziji obstaja polletno šolanje za sekserje po japonski metodi, čemur sledi tri do petletno praktično usposabljanje. Po japonski metodi lahko usposobljen sekser v eni uri z 98 % natančnostjo določi spol 2000 piščancev, čeprav samo 5 – 10 % kandidatov s tečajem dobi končno kvalifikacijo za ločevanje po tej metodi (Hoh, 1997 cit. po Phelps, 2001). Za piščance je to stresna metoda, ki lahko povzroči do 1 % začetnega

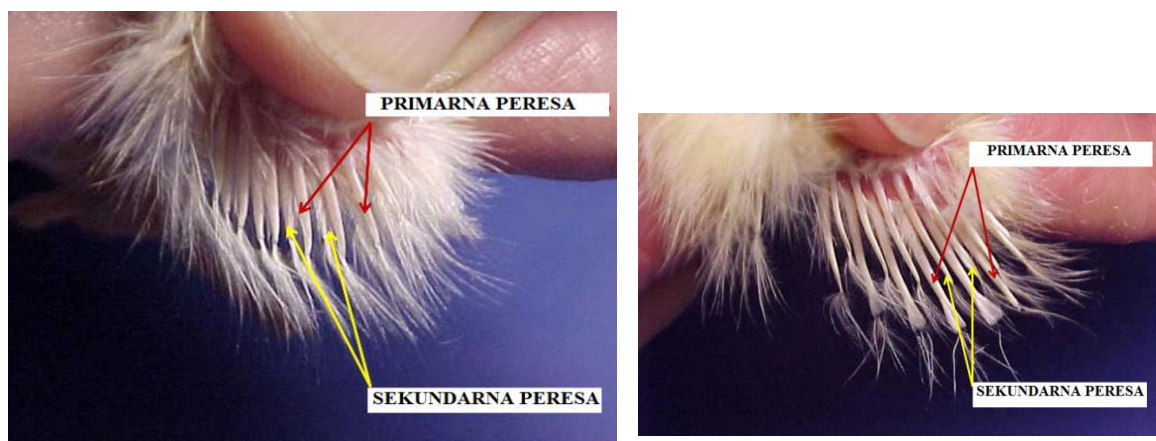
pogina piščancev (Phelps in sod., 2003). Dodatno se lahko pojavi navzkrižna kontaminacija od piščanca do piščanca v kolikor prvo blato v kloaki (mekonij) vsebuje patogene bakterije. Čeprav ima metoda določanja spola piščancev po kloaki veliko slabosti, se številne piščance seksira prav po tej metodi. Ljudje, ki so se te metode priučili, jo pa ne izvajajo vsakodnevno, dosegajo okrog 60-70 % natančnost (Bramwell, 2003).



Slika 5: Seksiranje piščancev po japonski metodi (How to sex chicken, 2016)

2.4.2.2 Seksiranje po hitrosti operjanja (zgodnje in pozno operjanje)

Pri tej metodi temelji določitev spola na ugotavljanju razlik v dolžinah tulcev primarnih in krovnih perutnih peres. Obstajajo pasme kokoši, ki se zgodaj operjajo in pasme kokoši, ki se pozno operjajo. Pri en dan starih piščancih zgodaj operjenih pasem so tulci krovnih perutnih peres krajši od tulcev primarnih peres, medtem ko so pri dan starih piščancih pozno operjenih pasem tulci krovnih peres na perutih enako dolgi ali celo daljši od tulcev primarnih peres (slika 6). Leghorn pasma kokoši, kot tudi pasme kokoši, ki so iz nje nastale, se običajno zgodaj operjajo, večina ameriških in ostalih težkih pasem pa se operja pozno (Card in Nesheim, 1966 cit. po Kaleta in Redmann, 2008). Geni, ki nadzirajo rast perja, se nahajajo na spolnih kromosomih pri čemer je gen za pozno operjanje dominanten nad genom za zgodnje operjanje. Pri končnih križancih je jarčka zgodaj operjena, petelinček pa pozno. Razlika v dolžini tulcev perutnih peres je lepo vidna že pri dan starih piščancih (slika 6), zato je ta metoda ločevanja precej enostavnejša od japonske metode (Phelps, 2001). Seksiranja po hitrosti operjanja ni mogoče izvajati pri purah in večini pasem kokoši težkega tipa. Ena od slabosti je tudi ta, da nastopa dominantni gen za pozno operjanje v tesni povezavi z endogenim virusom, ki lahko sproži imunološko toleranco na limfoidno levkoko (Crittendon in sod., 1987, cit. po Phelps, 2001).



Slika 6: Seksiranje po hitrosti operjanja (levo - pozna operjenost, desno - zgodnja operjenost) (Gershman, 2014)

2.4.2.3 Seksiranje po barvi puha

Nekateri dan stari križanci so nosilci spolno vezanih razlik v barvi perja, ki so vidne že ob izvalitvi piščancev. V kolikor medsebojno parimo kokoš z dominantnim, spolno vezanim genom za srebrno barvo perja s petelinom, ki je nosilec recesivnega gena za rjavo (zlato) barvo perja, bodo imele dan stare jarčke iz takega križanja rjavkast puh, pri petelinčkih bo puh svetel (rumen) (slika 7 – levo). Gen za grahasto barvo perja se prav tako nahaja na spolnem kromosomu in je dominanten nad genom za negrahasto barvo perja (Molyneux, 1929 cit. po Kaleta in Redmann, 2008). Če torej križamo kokoš, nosilko dominantnega gena za grahasto barvo perja s petelinom, ki je nosilec recesivnega gena za rjavo barvo perja, bodo dan stari piščanci iz takega križanja vsi črni, le petelinčki bodo imeli na glavi belo piko, ki je jarčke nimajo (slika 7 - desno).



Slika 7: Seksiranje piščancev po barvi puha (Dominant Brown D 102, 2016 – levo in Dominant Black D 109, 2016 - desno)

2.4.2.4 Seksiranje po številu lusk na nogah

Hampl (1992) je pri en dan starih piščancih opisal obliko in število kožnih lusk na stopalni površini konice tretjega prsta in ugotovil večje število lusk pri petelinčkih kot pri jarčkah. Z aplikacijo analitičnih tehnik, ki se uporabljajo za identifikacijo in medsebojno primerjavo prstnih odtisov pri človeku, opažanje Hampla (1992) o različnem številu lusk ni bilo potrjeno niti pri križancih, ki so izhajali iz pasme leghorn, niti pri nekaterih drugih križancih iz ljubiteljskih rej (Kaleta in Redmann, 2008).

2.4.2.5 Ultrazvočna preiskava en dan starih piščancev

Ultrazvok je zvok s frekvenco, višjo od zgornje meje slišnega območja. Diagnostični ultrazvočni aparati navadno delujejo s frekvencami 2-13 MHz. Preiskava z ultrazvokom je neinvazivna tehnika, s katero lahko dobimo vpogled v notranjost mehkih tkiv. Pri prostorskem sestavljanju slike pošlje naprava ultrazvočne valove v tkivo pod različnimi koti. Računalnik ovrednoti različne odboje iz istih struktur in izriše sliko na zaslonu (Ultrazvok, 2016). Kaleta in sod. (1994, cit. po Kaleta in Redmann, 2008) so poskušali s pomočjo ultrazvoka napraviti vidne spolne žleze pri komaj izvaljenih piščancih. V nobenem položaju piščancev (hrbtnem, trebušnem, stranskem) ni bilo mogoče identificirati spolnih žlez. Nežne, majhne strukture testisov in ovarijev v povezavi z neprisotnostjo razlik v gostoti tkiv, odbijajočim ultrazvočnim valovom niso omogočile vizualizacije spolnih žlez. Bili so tudi poskusi, da bi spol piščancev določili s pomočjo ultrazvoka, ki bi ga na spolne žleze usmerili iz črevesja. Zaradi možnosti navzkrižne kontaminacije, delovne zahtevnosti in počasnosti ta metoda ni doživela širše uporabe v praksi (Kaleta in Redmann, 2008).

2.4.2.6 Laparoskopija (kirurško seksiranje)

Laparoskopija je metoda, pri kateri s pomočjo posebne kamere (laparoscopa) pregledamo notranjost trebušne votline. Še posebej natančno si ogledamo reprodukcijske organe. Prednost te metode seksiranja je, da z njeno pomočjo ovrednotimo fizično stanje reprodukcijskega trakta in dobimo takojšnje rezultate. Jasno je, da so pri odraslih živalih spolne žleze lepše vidne kot pri mladih živalih, čeprav lahko izkušen strokovnjak na tem področju detektira razlike v spolnih tkivih tudi pri komaj izvaljenih piščancih. Za ogled spolnih organov z laparoskopom je treba na levi strani piščanca narediti manjšo zarezo. Pri mladih petelinčkih se modi vidita kot drobni, neprekravljeni tvorbi, medtem ko pri mladih jarčkah ovarija sploh ne najdemo. Pri nekoliko starejših jarčkah ima jajčnik zrnasto površino. Ko jarčka spolno dozoreva, kažejo folikli grozdasto obliko (Cerit in Avanus, 2007). Glavni slabosti laparoskopije sta potreba po anesteziji in nevarnost nenamerne poškodbe vitalnih organov. Za žival je lahko ta poseg tudi letalen (Swengel, 1996, cit. po Cerit in Avanus, 2007).

2.4.3 Inkubirana jajca: citogenetske in hormonske tehnike

2.4.3.1 Analize steroidnih hormonov v blatu

Ta metoda temelji na določitvi koncentracije estrogena/testosterona (E/T) v blatu (fecesu) živali. V fecesu jarčk je razmerje E/T večje kot v fecesu petelinčkov. Za test potrebujemo sveže vzorce blata. Zaradi medsezonske in starostne variabilnosti pride včasih do prekrivanj v razmerjih med hormoni, kar se zlasti rado zgodi zunaj paritvene sezone. Najbolj zanesljive rezultate je zato mogoče doseči pri odraslih živalih v času paritvene sezone (Swengel, 1996, cit. po Cerit in Avanus, 2007).

2.4.3.2 Analize steroidnih hormonov v jajcih

Ptičje jajce vsebuje znatne koncentracije različnih maternalnih hormonov. Rumenjak sveže znesenega jajca vsebuje maternalni estrogen, ki je v rumenjak prišel v času njegovega nastajanja v jajčniku. V zgodnji embriogenezi ti hormoni počasi poidejo. Zamenjajo jih spolno specifični hormoni, ki jih aktivno proizvaja rastoči zarodek. Po 7. do 14. dneh valjenja so v alantoisni tekočini prisotni hormoni obeh spolov in možno je njihovo merjenje (Phelps in sod., 2003). Koncentracija estradiola v alantoisni tekočini moškega zarodka je zelo nizka, manj kot 42 pg/ml. V alantoisni tekočini zarodka ženskega spola je kar nekajkrat večja in znaša 113 do 830 pg/ml. Na voljo je tehnološka oprema, ki omogoča pridobivanje manjših količin (< 40 µl) alantoisne tekočine iz jajc v poznih fazah razvoja zarodka (Phelps in sod., 2003). Rezultati meritev koncentracij estrogena so na voljo v nekaj urah, pri čemer je vzorce mogoče vzeti nekaj tisoč jajcem v eni uri (Phelps in sod., 2003). Pri tej tehniki je zelo pomemben pravilno izpeljan postopek vzorčenja, saj hormoni niso enakomerno razporejeni znotraj jajčne vsebine. Koncentracije se spreminjajo tudi med samim embrionalnim razvojem. Koncentracije hormonov naraščajo oziroma padajo zaradi sprememb v strukturi jajca ter zaradi njihovega izločanja in porabe s strani razvijajočega se zarodka. Ekstrakcija hormonov iz jajčnega rumenjaka in njihova kromatografska separacija za kasnejše biokemijske (imuno) teste lahko močno vpliva na rezultate, saj namreč omenjeni posegi odstranijo interferenčne snovi kot so beljakovine, lipidi, preostali hormoni in njihovi metaboliti, ki lahko z uporabljenim antiserumom navzkrižno reagirajo (Cerit in Avanus, 2007). Metoda zahteva veliko preverjanj, zlasti v povezavi z natančnostjo in specifičnostjo meritev hormonov, da lahko na koncu potrdimo značilno različne koncentracije hormonov v rumenjakih samcev od koncentracij hormonov v rumenjakih samic (Von Engelhardt in Groothuis, 2005, cit. po Cerit in Avanus, 2007).

2.4.3.3 Določitev kariotipa

Pri pticah so samice heterogametne (spolna kromosoma Z in W) in samci homogametni (dva kromosoma Z). Do teh spoznanj je z analizo kromosomov že leta 1926 prišel Hance (Hance, 1926 cit. po Kaleta in Redmann, 2008). Vzorec celic za izolacijo kromosomov in

izvedbo kariotipizacije je mogoče dobiti iz razvijajočih peres ali krvnih celic. Levkocite iz periferne krvi ali celice fibroblastov iz pulpe rastočih peres se vzgaja v tkivnih celičnih kulturah (Stefos in Arrighi, 1971, Takagi in Sasaki, 1974, vsi cit. po Kaleta in Redmann, 2008). V času metafaze se celično delitev ustavi z uporabo kolhicina. Celične stene se odpre z uporabo hipotonične solne raztopine, nato se celice barva in mikroskopsko opazuje spolne kromosome. V primeru prisotnosti kromosomskih aberacij zarodkov ni mogoče uspešno seksirati (Saefudin in sod., 2005). Ker je večina kromosomov pri pticah mikrokromosomov, jih je zelo težko natančno šteti. Spolni kromosom samic W je po velikosti primerljiv z večino mikrokromosomov. Ker je večji kromosom Z lahko ločiti od precej manjšega kromosoma W, je identifikacija spola glede na spolne kromosome zelo praktična (Archawaranon, 2004 cit. po Cerit in Avanus, 2007). Izkušen citogenetik lahko pridobi natančne rezultate znotraj znanstveno opredeljenih časovnih okvirjev. Glavni slabosti analiz kromosomov sta časovna zamudnost in težave pri pridobivanju vitalnih celic iz kultur. Pri neletalcih, npr. nojih, omenjene metode zaradi majhne razlike v velikosti Z in W kromosoma ni mogoče uporabiti (Malagó in sod., 2002).

2.4.3.4 Ultrazvok *in ovo*

Pugh in sod. (1993) so uporabili ultrazvok za raziskovanje notranje morfologije kokošjega jajca v različnih razvojnih stadijih zarodka.

Ker ultrazvočni valovi ne morejo prodreti skozi jajčno lupino in zračni mehurček, so v lupini naredili majhno odprtino (okence). Po opravljenem posegu so odprtino v lupini prekrili z dializno membrano ali navadnim selotejpom. Po poročanju Pugh in sod. (1993) je bila valilnost piščancev ob tem posegu le malenkostno prizadeta.

2.4.3.5 Srčni utrip zarodka

Do določene stopnje se srčni utrip razlikuje med spoloma, kar velja tako za odrasle živali kot tudi za zarodke (Glahn in sod., 1987). Gibanje zarodka v jajcu preprečuje, da bi pred 15. dnevom valjenja natančno izmerili njegov srčni utrip. Spremljanje srčnega utripa med 15. in 20. dnevom valjenja kaže na to, da imajo podobno kot pri odraslih živalih samice nekoliko večji srčni utrip kot samci. Glahn in sod. (1987) poročajo, da se pri uporabi nekoliko višjih temperatur valjenja (39,4°C za 15 do 45 minut) število utripov srca na minuto poveča pri obeh spolih in razlike med njima niso več značilne. Nasprotno nižje temperature valjenja (26,1°C za 30 do 120 minut) zmanjšajo število srčnih utripov na minuto. Glahn in sod. (1987) ugotavljajo, da je seksiranje piščancev na osnovi srčnega utripa predvsem zaradi prekrivanja vrednosti med spoloma zelo nepraktično.

2.4.3.6 DNK tehnike

DNK tipiziranje je postala zelo obetavna metoda določanja spola po napredku v razvoju DNK tehnologij. Večina DNK tehnik temelji na reakciji s polimerazo (PCR). V 70-ih in

80-ih letih prejšnjega stoletja so bile raziskave DNK težavne, drage in počasne. Z razvojem novih metod so postale enostavnejše, cenejše in hitrejše. Iznajdba naprave za izvedbo reakcije s polimerazo (PCR) v sredini 80-ih let je v molekularni genetiki sprožila pravo revolucijo. Prav gotovo je PCR eno od najmočnejših orodij, s katerim razpolagajo molekularni biologi (Alberts in sod., 2002, Russel, 2002, Klug in Cummings, 2000, vsi cit. po Cerit in Avanus, 2007). Za izolacijo DNK se najpogosteje koristi kri ali perje. Izolacija DNK iz perja je težavna, kajti DNK je mogoče pridobiti le iz celic na konici peres. Na zunanji strani perja se nahajajo stare kožne celice, v notranjosti pa stare krvne celice (Honkatukia in sod., 2003 cit. po Cerit in Avanus, 2007).

Na splošno dobimo zadostno število celic za analizo, če živalim s področja prsi populimo 3-5 peres. Seveda lahko količina vzorca precej variira v odvisnosti od vrste ptice in velikosti peres. Perje lahko zberemo precej prej kot vzorce krvi, zato lahko brez povzročitve večje škode DNK analize opravimo na zelo zgodnji stopnji razvoja (Malago in sod., 2002). Poleg tega lahko odvzeto perje do začetka izvajanja analiz globoko zamrznemo. Z izolacijo DNK iz perja žival ne doživi stresa in izognemo se preveliki izgubi krvi. Prvi, ki so poročali o izvedbi DNK tipiziranja pri pticah so bili Saitoh in sod. (1991, cit. po Cerit in Avanus, 2007). S tehniko hibridizacije s tako imenovano XhoI sondo, ki je specifična za W kromosom, so na tem kromosomu odkrili družino ponavljajočih se nukleotidnih zaporedij, ki so jo označili z oznako EcoRI. Ugotovili so, da 70 – 90 % DNK na kromosomu W tvorijo ponavljajoča zaporedja nukleotidov. Z uporabo tehnike PCR in začetnih oligonukleotidov, specifičnih za ponavljajoči se element XhoI sta Petite in Keglemeyer (1992, cit. po Cerit in Avanus, 2007) identificirala spol kokošjih zarodkov v zgodnji fazi razvoja. Clinton (1994, cit. po Cerit in Avanus, 2007) je z uporabo encima proteinaza K izoliral DNK iz 5-7 dni starih zarodkov. Za pomnoževanje v reakciji PCR je uporabil za kromosom W specifične začetne oligonukleotide. Do rezultatov je prišel v enem dnevu in pri tem porabil manj kot 1 nanogram DNK. Canon in sod. (2000, cit. po Cerit in Avanus, 2007) so s pomočjo pretočne citometrije jedrne DNK skušali identificirati spol pri treh vrstah papig. Natančnost določitve je znašala 51,3 %, 94,4 % in 100 %, pri čemer je shranjevanje vzorcev pri temperaturi 4 °C za 48 ali 72 ur povzročilo variabilnost v vsebnosti DNK. V dosedanjem delu so raziskovalci uporabili že več različnih molekularnih označevalcev za identifikacijo spola pri pticah kot npr.:

a) RFLP (angl. »Restriction Fragment Length Polymorphism« – polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov). RFLP-ji so odseki encimsko razrezane DNK (običajno velikosti 2-10 kb), ki jih ločimo z gelsko elektroforezo in odkrijemo s kasnejšo hibridizacijo po Southernu (Terčič, 2004). Označevalce RFLP so uporabili za določanje spola pri goseh, galebih in labodih.

b) Minisateliti so molekularni označevalski lokusi, ki sestojijo iz zaporednih ponovitev 10-50 bp dolgih motivov. Minisateliti obkrožajo ohranjena endonukleazna cepitvena mesta. Odkrijemo jih z gelsko elektroforezo encimsko razrezane DNK in kasnejšo hibridizacijo po Southernu, v kateri uporabimo radioaktivno označeno DNK sondo, ki vsebuje večje

število kopij jedrnega zaporedja minisatelita (Terčič, 2004). Miyaki in sod. (1997, cit. po Cerit in Avanus, 2007) so človeško minisatelitsko sondo 33.15 uporabili za določanje spola pri 33 vrstah južno ameriških papig.

c) RAPD (angl. »*Random Amplified Polymorphic DNA*« - naključno pomnožena polimorfna DNK). RAPD-i so v verižni reakciji s polimerazo (PCR) pomnoženi odseki DNK. V reakcijo vključimo kratke, običajno 10 bp dolge začetne oligonukleotide z naključnim zaporedjem baz. Večinoma se v reakcijo vključi le en začetni oligonukleotid (Terčič, 2004). Če se odbrani RAPD označevalec nahaja na kromosomu W, bo predstavljal za samice specifičen označevalec (Welsh in McClelland, 1990).

č) Mikrosateliti so molekularni označevalski lokusi, ki sestojijo iz zaporedno razporejenih ponavljajočih enot zelo kratkega, 1-5 baznih parov dolgega nukleotidnega motiva. V kolikor poznamo nukleotidna zaporedja v regijah, ki obkrožajo mikrosatelit, oblikujemo specifične, običajno 20-25 bp dolge začetne oligonukleotide in mikrosatelit pomnožimo v reakciji PCR. Dolžina pomnoženih produktov je okrog 100 bp (Terčič, 2004).

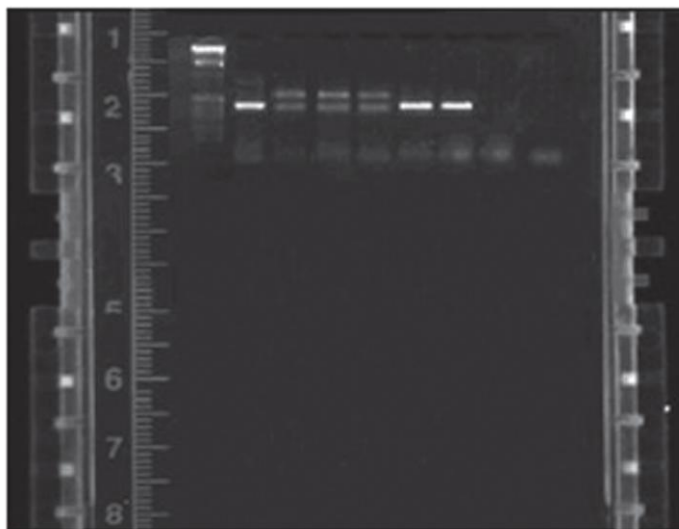
d) AFLP (angl. »*Amplified Fragment Length Polymorphism*«). AFLP-ji so 80-500 bp dolgi odseki DNK, ki jih dobimo z encimsko cepitvijo z endonukleazo, čemur sledi ligacija oligonukleotidnih adapterjev na odseke in selektivno pomnoževanje v reakciji PCR. Začetni oligonukleotidi PCR sestojijo iz jedrnega zaporedja (del adapterja), specifičnega zaporedja, ki ga razpozna restriksijski encim in enega do treh odbranih nukleotidov (Terčič, 2004). Griffiths in Orr (1999) sta označevalce AFLP uporabila za določanje spola pri nojih.

2.4.3.7 CHD geni

Odkritje gena za kromo-helikaza-DNK-vezavni protein (CHD), ki se nahaja na kromosomu W (CHD1W), je omogočilo identifikacijo spola pri večini vrst ptic. Kmalu po tem odkritju je bila odkrita zelo sorodna kopija tega gena na kromosomu Z (CHD1Z). Gena CHD1W in CHD1Z sta se razvila neodvisno eden od drugega. Znano je, da so si glede na aminokislinsko zaporedje beljakovinske strukture CHD1W in CHD1Z medsebojno zelo podobne (Fridolfsson in Ellegren, 2000). Zaradi morfološke podobnosti kromosoma Z in W in posledično neobstoja dimorfizma med genoma CHD, te metode ni mogoče uporabiti za razlikovanje spola pri pticah, ki sodijo v red nojevcev (noj, emu, nandu, kivi) (Ansari in sod., 1988).

Beljakovine, ki jih kodira gen CHD, imajo vlogo pri regulaciji transkripcije na ravni kromatina. Vplivajo na kondenzacijo kromatina, zaradi česar je ta gen dobro ohranjen v celotnem ptičjem svetu (Griffiths in Tiwari, 1996). Kodirajoča zaporedja obeh genov so strogo ohranjena. Zato sta oba gena (CHD1W in CHD1Z) enake velikosti in ju na gelu po opravljeni elektroforezi ni mogoče ločiti. Griffiths in sod. (1998) so razvili metodo istočasnega pomnoževanja homolognih delov genov CHD1W in CHD1Z v reakciji PCR ob prisotnosti specifičnih začetnih oligonukleotidov. Ti se vežejo na ohranjeno eksonsko

regijo v obeh kopijah gena. V reakciji PCR pride do pomnoževanja nekodirajočega introna, ta pa ima pri genih CHD1W in CHD1Z različno dolžino, saj je intronska regija izpostavljena hitrim spremembam in mutacijam. Zaradi prisotnosti dodatnih DNK baz v intronski regiji je pri večini vrst ptic dolžina gena CHD na kromosomu W nekoliko večja od dolžine CHD gena na kromosomu Z (Cerit in Avanus, 2007). V reakciji PCR nastanejo različno veliki odseki genov CHD1W in CHD1Z, ki jih lahko z elektroforezo v gelu razdvojimo po velikosti. Po opravljeni elektroforezi in barvanju DNK sta v gelu vidni dve progi, če gre za samico, in ena proga, ko gre za samca. Samice ptic so namreč heterogametne in razpolagajo z dvema aleloma (ZW), samci pa so homogametni in razpolagajo z dvema kopijama istega alela (ZZ). Zato dvojne proge na 5 % agaroznem gelu pripadajo samicam, medtem ko je za samce značilna ena sama proga (slika 8). Na sliki 8 so prikazani PCR produkti, ki so bili pomnoženi z uporabo začetnih oligonukleotidov P2 in P8 in nato ločeni z gelsko elektroforezo. Uporabljena je bila DNK nimfe (papige) (*Nymphicus hollandicus*) (Cerit in Avanus, 2007). Na sliki 8 se z leve proti desni najprej vidi standardni označevalec velikosti fragmentov DNK, nato se vidi ena močnejše izražena proga (samec), sledijo tri kolone z dvema šibkeje izraženima progama (tri samice) ter nato še dve koloni s po eno močnejše izraženo progno (dva samca).



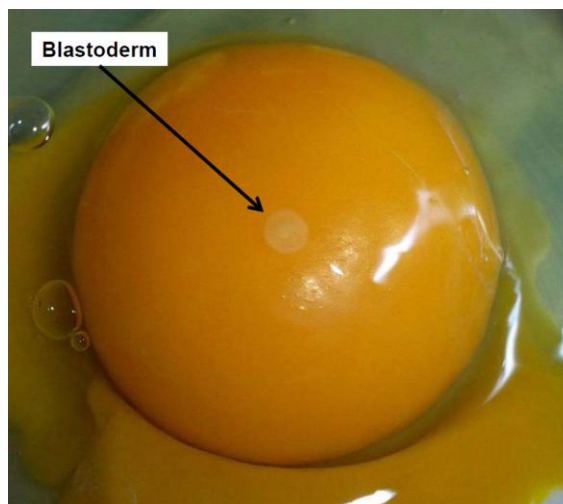
Slika 8: Določitev spola pri papigah nimfah s tehniko pomnoževanja genov CHD v reakciji PCR (Cerit in Avanus, 2007)

2.4.4 Neinkubirana jajca

2.4.4.1 Iskanje spolno vezanih genov v blastodermalnih celicah neinkubiranih jajc

Več poskusov je bilo opravljenih z namenom določitve spolnih kromosomov v blastodermalnih celicah valilnih jajc pred vlaganjem v valilnike. Blastoderm sveže

znesenega oplojenega jajca sestavlja približno 40 do 60 tisoč celic (Ellendorff in Klein, 2003) (slika 9).



Slika 9: Celice blastoderma na rumenjaku (Question about eggs... PIC, 2008)

Metoda ultrazvoka se ni izkazala za najprimernejšo v lociranju blastoderma, so pa Klein in sod. (2003) za iskanje blastoderma uspešno uporabili nuklearno magnetno resonanco. Običajno se odstrani majhno število (cca. 4 do 400) celic blastoderma, nato se s tehniko verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR) odkrije spolno specifična ponavljajoča nukleotidna zaporedja. Z biopsijo se odstrani celice iz obrobja blastoderma, izolira se celična DNK, nato pa se gen, ki je specifičen za kromosom W (ženski spol) pomnoži v reakciji PCR ter izpostavi delovanju restrikcijskega encima Xho1. Nastale proizvode se po velikosti loči na agaroznem gelu in jih napravi vidne z barvanjem z etidijevim bromidom (Klein in sod., 2003). Celice samic, ki vsebujejo kromosoma ZW, puščajo na gelu progo, celice samcev pa ne. Čeprav se zdi, da je ta postopek časovno zamuden, delovno intenziven ter zahteva drago opremo, je preživitvena sposobnost zarodkov in s tem valilnost le neznatno prizadeta (Kaleta in Redmann, 2008).

2.4.4.2 Določanje spola na osnovi oblike jajca

Oblika jajca se običajno izraža z indeksom oblike, ki predstavlja razmerje med širino in dolžino jajca, pomnoženo s 100. Popolnoma okroglo jajce ima indeks oblike 100, pri podolgovatih pa se ta vrednost giblje v razponu od 50 do 80. Optimalen indeks kokošnjega jajca je okrog 74, pri čemer na vrednost vplivata pasma in starost živali (Grashorn, 1987 cit. po Kaleta in Redmann, 2008). Razlike v obliki obstajajo znotraj iste vrste oziroma pasme živali. Podatki, ki bi govorili o povezavi med indeksom oblike in spolom živali ne obstajajo. Bönner in sod. (2004) so na osnovi analiz 289 jajc kanadske gosi (*Branta canadensis*) ugotovili določene povezave med indeksom oblike jajc in spolom zarodkov.

2.4.5 Vplivi okoljskih dejavnikov na spol pri pticah

2.4.5.1 Spreminjanje temperature med valjenjem

Pri nekaterih vrstah plazilcev je mogoče s spreminjanjem temperature med valjenjem vplivati na delež moških oziroma ženskih potomcev (Booth, 2006). Nekateri raziskovalci poročajo, da lahko temperatura med valjenjem vpliva na določene procese na molekularnem nivoju, ki lahko vplivajo na determinacijo spola pri perutnini, plazilcih in zlasti pri kačah (Graves in Shetty, 2001, Crews, 2003, Goth in Booth, 2005, vsi cit. po Yilmaz in sod., 2011). Številne raziskave na ptičjih jajcih nedvoumno dokazujejo, da ima malenkostno povečanje temperature med valjenjem (več kot 38°C) za posledico velik delež zarodkov s spačeno glavo, okončinami in notranjimi organi. Še višje temperature, nad 39°C, povzročijo smrt zarodkov (Hutt, 1927, Romanoff, 1960, Nichelmann in Tzschenske, 2002, Baarendse in sod., 2007, vsi cit. po Kaleta in Redmann, 2008). Nekoliko nižje temperature od optimalne le podaljšajo čas valjenja brez drugih sprememb (Romanoff in Romanoff, 1972; Thompson in sod., 1976 cit. po Kaleta in Redmann, 2008). Za razliko od plazilcev pri pticah torej ni mogoče uporabiti velikih odmikov od optimalne temperature med valjenjem, da bi s tem vplivali na spol izvaljenih živali. Iz sveta ptic je znan primer, da avstralska ščetkasta pura (*Alectura lathamii*) za valjenje izkorišča okoljske temperature (npr. temperature, ki se razvijajo znotraj kompostnega kupa). Običajno razmerje med spoloma 1:1 se pri nižjih temperaturah valjenja nagne v smeri večjega števila samcev, pri višjih temperaturah valjenja pa se vali več samic (Goth in Booth, 2005).

2.4.5.2 Obsevanje valilnih jajc z X žarki

Collignon (1928, cit. po Kaleta in Redmann, 2008) poroča o raziskavi, opravljeni na poskusni postaji v New Jerseyu (ZDA), v kateri so valilna jajca med valjenjem obsevali z X žarki. Iz jajc, ki so jih obsevali dalj časa, so se valile izključno samo jarčke in te so kasneje rastle hitreje od jarčk, ki so se valile iz neobsevanih jajc. Potrditev teh rezultatov ni bila objavljena v nobeni kasnejši publikaciji (Kaleta in Redmann, 2008).

2.5 MOŽNE ALTERNATIVE USMRTITVAM PETELINČKOV LAHKEGA TIPA

V svetu znanstveniki iščejo praktično metodo za določanje spola kokošjih zarodkov, s katero bi naredili konec dosednji praksi usmrtitve odvečnih petelinčkov lahkega tipa. Največ pozornosti se posveča naslednjim trem »biotehnološkim« pristopom (Aslam, 2014):

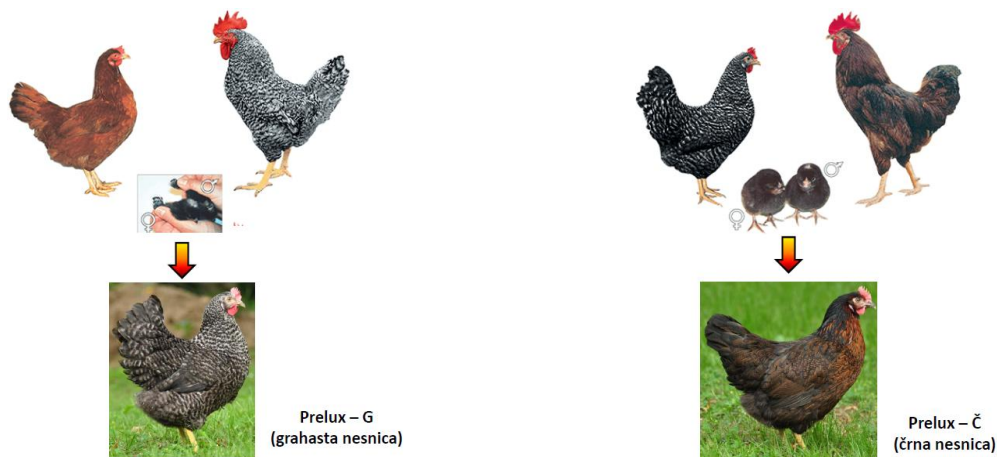
a) Določitev spola *in ovo* na svežih (neinkubiranih) valilnih jajcih – iz svežega valilnega jajca se vzame vzorec celic blastoderma, ugotovi se spol zigote in v valilnike vloži samo jajca, iz katerih se bodo valile jarčke.

- b) Vpliv na primarno razmerje med spoloma – z vplivanjem na kokoš doseči, da se v skupnem številu znesenih valilnih jajc zmanjša delež tistih, iz katerih se valijo petelinčki oziroma obratno, poveča delež tistih, iz katerih se valijo jarčke.
- c) Z modifikacijo spolnih kromosomov doseči, da bi lahko valilna jajca seksirali pred njihovim vlaganjem v valilnike.

Na univerzi v Leipzigu (Nemčija) razvijajo prototip naprave, s katero bi določili spol kokošjih zarodkov po treh dneh valjenja (Germany Aims..., 2015). Metoda temelji na uporabi bližnje infrardeče Ramanske spektroskopije. Infrardeča svetloba z valovnimi dolžinami v območju 1–100 μm ima večjo valovno dolžino od ultravijolične in vidne, zato imajo njeni fotoni nižjo energijo. Le-ta zadošča za vzbujanje nihanj atomov v molekulah in vrtenja (rotacije) molekul. Spektroskopska metoda določanja spola izkorišča razlike v velikosti spolnih kromosomov. Po treh dneh valjenja razvije zarodek majhne krvne žile, ki jih je mogoče uporabiti za ločevanje moških in ženskih zarodkov. Z laserjem najprej naredijo mikroskopsko odprtino v jajčni lupini vsakega jajca. Nato z Ramansko spektroskopijo spustijo v jajce infrardečo svetlobo točno določene valovne dolžine in analizirajo vzorec razsipa svetlobe iz krvnih celic zarodka. Na osnovi slednjega ugotovijo spol zarodka. V nadaljevanju postopka luknjico v lupini zatesnijo in naprej valijo samo jajca, v katerih se nahajajo zarodki ženskega spola. Odvečna jajca z zarodki moškega spola je moč uporabiti v več industrijskih postopkih kot npr. v proizvodnji krme za živali ali v kemijski industriji. Po trditvah koordinatorice projekta na univerzi v Leipzigu traja seksiranje enega jajca okrog 15 do 20 sekund, pri čemer obstajajo realne možnosti, da se postopek skrajša na čas pod 10 sekundami. V prihodnje bodo delali na optimizaciji in avtomatizaciji bližnje infrardeče spektroskopije na način, da med posegom ne bi prihajalo do poškodb zarodkov ženskega spola (Germany aims..., 2015).

3 MATERIALI IN METODE DELA

V poskusu smo uporabili 1497 valilnih jajc, ki so izhajala iz matičnih jat za pridobivanje dveh križank lahkega (nesnega) tipa slovenske provenience Prelux: Prelux-G (grahasta nesnica = 750 valilnih jajc) in Prelux-Č (črna nesnica = 747 valilnih jajc). Matični jati za križanki Prelux-G in Prelux-Č sta bili uhlevljeni na perutninski farmi Krumperk Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete.



Slika 10: Shemi parjenj za pridobivanje križank Prelux-G (levo) in Prelux-Č (desno) (Terčič D., 2015)

Prelux-G je dvopasemska križanka pozno operjenih rjavih kokoši (slovenska rjava kokoš) in zgodaj operjenih grahastih petelinov (slovenska grahasta kokoš) (slika 10 – levo). Dan stari piščanci imajo črn puh, grahasti vzorec postane viden šele pozneje. Križanka Prelux-G je avtoseks križanka, saj lahko en dan stare piščance ločimo po spolu po hitrosti operjanja. Jarčke se operjajo zgodaj (tulci krovnih peres na perutih so krajši od tulcev primarnih peres), petelinčki pa pozno (tulci krovnih peres na perutih so enako dolgi ali daljši od tulcev primarnih peres). Prelux-Č je avtoseks križanka grahastih kokoši (slovenska grahasta kokoš) in rjavih petelinov (slovenska rjava kokoš) (slika 10 – desno). Za razlikovanje spola po barvi puha izkoriščamo spolno vezan gen za grahasto barvo perja, ki je dominanten nad genom za ne-grahasto ali enobarvno črno barvo. Izvaljene Prelux-Č jarčke in petelinčki so popolnoma črni s to razliko, da imajo petelinčki na glavi belo liso, ki je jarčke nimajo.

Dodatno imajo en dan stare jarčke temneje pigmentirane noge kot petelinčki. Matični jati, iz katerih smo dobili valilna jajca za nesnici Prelux-G in Prelux-Č, sta bili na začetku zbiranja valilnih jajc stari 24 tednov, na koncu 26 tednov. Poskus je potekal v času od 07. 10. 2015 (pobrana prva valilna jajca) do 05. 11. 2015 (datum izvalitve piščancev). Znotraj vsakega od dveh genotipov so jajca ob vlaganju v valilnik pripadala petim različnim starostim: 1 dan stara, 3, 5, 6 in 8 dni stara. Da bi lahko vsa jajca vložili v valilnik istočasno na isti dan, smo prva pobrali 8 dni pred vlaganjem, zadnja, 1 dan stara, pa na dan

vlaganja v valilnik. Po dostavi jajc iz perutninske farme smo le-ta do trenutka vlaganja v valilnik hranili v hladilnici na temperaturi 15 °C in relativni zračni vlagi 75 %. Med skladiščenjem jajc nismo obračali. Na dan vlaganja jajc v predvalilnik smo na lupino vsakega jajca zapisali njegovo identifikacijsko številko, starost in provenienco kokoši, kateri je pripadalo. V nadaljevanju smo vsako jajce stehali s pomočjo elektronske tehtnice, mu izmerili širino in višino ter določili barvo lupine. Iz podatka o širini in višini jajca, ki smo ju izmerili z digitalnim kljunastim merilom, smo izračunali indeks oblike jajca po formuli:

$$\text{Indeks oblike} = (\text{širina jajca} \div \text{višina jajca}) \times 100 \quad \dots (1)$$

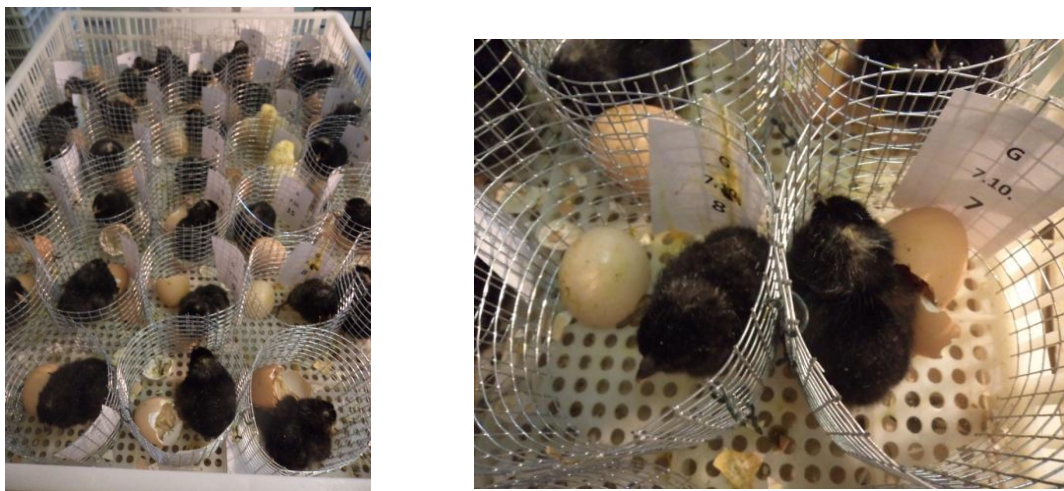
Za merjenje barve jajčne lupine smo uporabili reflektometer, ki meri odstotek odbite svetlobe s površine lupine. Bolj temna kot je lupina, manj svetlobe se odbije z njene površine (Holcman in sod., 2005). Reflektometer smo pred vsakim začetkom merjenja umerili z dvema vzorčnima umeritvenima ploščicama črne (vrednost 0,00 %) in bele barve (vrednost 82,10 %). Meritve smo opravljali na čistem in nepoškodovanem topem delu jajca. Za izračun prostornine (volumna) in površine jajca smo uporabili formuli, ki ju je opisal Narushin (2005):

$$V (\text{volumen v cm}^3) = (0,6057 - 0,0018 \times \check{S}) \times D \times \check{S}^2 \quad \dots (2)$$

$$P (\text{površina v cm}^2) = (3,155 - 0,0136 \times D + 0,0115 \times \check{S}) \times D \times \check{S} \quad \dots (3)$$

kjer $\check{S}$ označuje širino in D dolžino (višino) jajca.

Po izvedbi vseh meritev zunanjih lastnosti valilnih jajc smo le-ta s koničastim delom navzdol vložili na lese predvalilnika in jih v predvalilniku zaplinili (razkužili) s plinom formaldehidom. Valjenje je potekalo v valilnikih znamke Petersime (Petersime, Zulte, Belgija), in sicer prvih 18 dni v predvalilniku S168 in zadnje 3 dni v izvalilniku H168. Termostati v predvalilniku so bili naravnani na temperaturo 37,8 °C, relativna zračna vlaga je znašala 60 %, obračanje jajc pod kotom 45° v levo oziroma desno je potekalo avtomatsko, enkrat na uro. Po 14. dneh valjenja smo vsa jajca presvetlili z ovoskopom in izločili tista, v katerih ni prišlo do razvoja zarodka. Osemnajsti dan valjenja smo vsa jajca premestili iz predvalilnika v izvalilnik, kjer je bila temperatura 37,2 °C in relativna zračna vlaga 70 %. V izvalilnikih se jajc ni več obračalo. Da bi lahko sledili povezavi med posameznim jajcem in piščancem, ki se je iz tega jajca izvalil, smo znotraj les (plastičnih zabojev) izvalilnika iz pocinkane mreže oblikovali pregradne prostorčke (slika 11). Vsakega od teh prekatov smo označili z oznako jajca, ki smo ga vložili vanj.



Slika 11: Piščanci ob izvalitvi v lesah izvalilnika (foto: D. Makovec)

Ob prelaganju valilnih jajc iz les predvalilnika v individualne prekate v lesah izvalilnika (18. dan valjenja) smo vsako jajce stehali. Enaindvajseti dan valjenja smo iz izvalilnika pobrali izvaljene piščance. Vsakega piščanca smo stehali ter mu določili spol. Križankam Prelux-G smo spol določili po hitrosti operjanja, križankam Prelux-Č pa po barvi puha. Ločevanje po spolu je opravilo izkušeno valilniško osebje, ki tovrstna opravila izvaja rutinsko.

3.1 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Dobljene podatke o zunanjih lastnostih valilnih jajc in o rezultatih valjenja smo vnesli v program Excel v okolju Windows ter pripravili preglednice za statistično obdelavo. Osnovne statistične parametre (srednja vrednost, standardni odklon, minimalna in maksimalna vrednost, koeficient variabilnosti) smo izračunali s proceduro MEANS, število izvaljenih piščancev posameznega spola po posamezni križanki in starosti jajc pa določili s proceduro FREQ. Odnos med odvisno spremenljivko (spol izvaljenega piščanca) in več neodvisnimi (pojasnjevalnimi) spremenljivkami (zunanje lastnosti valilnih jajc) smo proučevali z regresijsko analizo. Ker je bila odvisna spremenljivka kategorialna in binarna oziroma dihotomna, kar pomeni, da je zavzela dve različni vrednosti (1 in 2 oziroma petelinček in jarčka), smo povezavo med zunanjimi lastnostmi valilnih jajc in spolom piščancev ugotavljali z multivariatno logistično regresijo. Za ta namen smo uporabili proceduro LOGISTIC, ki je tako kot proceduri MEANS in FREQ dostopna znotraj programskega paketa SAS/STAT (SAS User Guide, 2008). Z uporabo procedure LOGISTIC smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv več neodvisnih spremenljivk hkrati na odvisno spremenljivko (multivariatni model). Model logistične regresije uporablja dva pojma: obeti (angl. »odds«) in razmerje obetov (angl. »odds ratio«). Iz obetov za dogodek

(žival je petelinček/jarčka) smo izračunali njihovo razmerje. Pri tem smo se odločili, da bodo jarčke referenčna skupina in obete »nereferenčne« skupine delili z obeti referenčne skupine. Za izračun Pearsonovega koeficienta korelacije smo uporabili v okviru statističnega paketa SAS/STAT (SAS User Guide, 2008) proceduro CORR, za izračun parametrov enostavne linearne regresije pa proceduro REG.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OSNOVNA STATISTIKA

V preglednicah 1 do 5 so prikazani osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti valilnih jajc križank Prelux-G in Prelux-Č. Iz preglednic je razvidno, da so imela pri vseh starostih jajca križank Prelux-Č svetlejšo jajčno lupino (večji odstotek odbite svetlobe s površine lupine) od jajc križank Prelux G.

Preglednica 1: Osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti en dan starih valilnih jajc pri dveh križankah kokoši

Starost jajc: 1 dan							
Križanka	Št. vloženih jajc	Lastnost valilnega jajca	Povp.	SD	Min.	Maks.	KV (%)
Px-Č	103	Širina jajca (cm)	4,10	0,10	3,84	4,36	2,51
	103	Višina jajca (cm)	5,27	0,22	4,10	5,77	4,29
	103	Indeks oblike	77,86	3,77	70,36	98,29	4,84
	103	Barva lupine (%)	45,84	8,25	26,50	72,10	18,01
	103	Masa jajca ob vlaganju (g)	50,47	3,21	43,2	58,00	6,36
	103	Masa jajca ob prelaganju (g)	43,99	3,02	37,00	51,80	6,87
	103	Masa piščanca (g)	32,89	2,34	26,80	39,10	7,12
	103	Izguba mase jajca do 18. dne (g)	6,48	1,08	3,80	9,70	16,73
	103	Volumen jajca (cm ³)	53,13	3,82	39,84	60,97	7,20
	103	Površina jajca (cm ²)	67,73	3,60	51,97	74,36	5,31
Px-G	100	Širina jajca (cm)	4,18	0,08	4,00	4,45	2,12
	100	Višina jajca (cm)	5,37	0,16	5,00	5,80	3,10
	100	Indeks oblike	77,78	2,74	70,79	84,31	3,53
	100	Barva lupine (%)	35,66	7,57	22,80	55,40	21,23
	100	Masa jajca ob vlaganju (g)	53,46	2,82	46,70	60,20	5,28
	100	Masa jajca ob prelaganju (g)	46,61	3,02	38,30	53,00	6,47
	100	Masa piščanca (g)	35,04	2,58	24,90	39,60	7,36
	100	Izguba mase jajca do 18. dne (g)	6,84	1,64	4,00	14,50	24,00
	100	Volumen jajca (cm ³)	56,28	3,11	49,07	65,09	5,53
	100	Površina jajca (cm ²)	70,40	2,75	63,45	76,64	3,91

Px-Č=Prelux-Č; Px-G=Prelux-G; Povp.=srednja vrednost; SD=standardni odklon; Min.=minimalna vrednost; Maks.=maksimalna vrednost; KV=koeficient variabilnosti

Jajčno lupino obarvajo pigmenti, ki nastajajo v maternici v času, ko se oblikuje jajčna lupina. Tip pigmenta je odvisen od pasme in je torej genetsko določen. Obe križanki, Prelux-Č in Prelux-G, neseta jajca z lupino rjave barve (Holcman in sod., 2005). Za rjavo barvo so odgovorni pigmenti protoporfirin-IX, biliverdin-IX in cinkov kelat, ki so razporejeni po celotni lupini in kutikuli (Baird in sod., 1975 cit. po King'ori, 2012). Največ je protoporfirina IX. Maternalni pasmi, ki sodelujeta pri nastanku križank Prelux-Č in Prelux-G sta bili več let selekcionirani na nekoliko temnejše rjave lupine, in sicer na osnovi subjektivnih vrednotenj in instrumentalnih meritev (Holcman in sod., 2005).

Preglednica 2: Osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti tri dni starih valilnih jajc pri dveh križankah kokoši

Starost jajc: 3 dni							
Križanka	Št. vloženi jajc	Lastnost valilnega jajca	Povp.	SD	Min.	Maks.	KV (%)
Px-Č	99	Širina jajca (cm)	4,09	0,13	3,82	5,12	3,41
	99	Višina jajca (cm)	5,23	0,17	4,91	5,69	3,38
	99	Indeks oblike	78,29	3,59	70,82	98,08	4,59
	99	Barva lupine (%)	44,86	7,22	29,10	65,60	16,10
	99	Masa jajca ob vlaganju (g)	49,38	3,30	35,30	58,70	6,69
	99	Masa jajca ob prelaganju (g)	42,84	4,47	9,20	52,30	10,43
	99	Masa piščanca (g)	32,27	2,28	27,90	38,50	7,09
	99	Izguba mase jajca do 18. dne (g)	6,53	3,49	-5,10	37,70	53,47
	99	Volumen jajca (cm ³)	52,70	4,34	45,16	81,62	8,23
	99	Površina jajca (cm ²)	67,22	3,36	60,30	83,99	5,00
Px-G	103	Širina jajca (cm)	4,23	0,09	4,04	4,63	2,32
	103	Višina jajca (cm)	5,42	0,21	4,10	5,89	3,94
	103	Indeks oblike	78,19	3,26	71,98	99,51	4,17
	103	Barva lupine (%)	35,20	7,47	16,40	64,10	21,24
	103	Masa jajca ob vlaganju (g)	55,54	3,29	48,90	66,80	5,93
	103	Masa jajca ob prelaganju (g)	48,99	3,18	42,20	58,10	6,49
	103	Masa piščanca (g)	36,32	2,39	31,50	43,00	6,58
	103	Izguba mase jajca do 18. dne (g)	6,55	1,52	-3,30	10,80	23,23
	103	Volumen jajca (cm ³)	58,42	4,10	40,83	71,71	7,02
	103	Površina jajca (cm ²)	72,06	3,71	52,62	81,20	5,15

Px-Č=Prelux-Č; Px-G=Prelux-G; Povp.=srednja vrednost; SD=standardni odklon; Min.=minimalna vrednost; Maks.=maksimalna vrednost; KV=koeficient variabilnosti

Podatki iz literature navajajo, da je za barvo lupine značilna heritabiliteta v razponu od 0,46 do 0,50 (Förster in sod., 1996, Zhang in sod., 2005, Flock in sod., 2007, vsi cit. po Caverio in sod., 2012). Rezultati naše raziskave to potrjujejo, saj je bila barva jajčne lupine poleg izgube mase jajca med valjenjem najbolj variabilna lastnost (preglednice 1-5).

Preglednica 3: Osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti pet dni starih valilnih jajc pri dveh križankah kokoši

Starost jajc: 5 dni							
Križanka	Št. vloženih jajc	Lastnost valilnega jajca	Povp.	SD	Min.	Maks.	KV (%)
Px-Č	100	Širina jajca (cm)	4,10	0,10	3,85	4,40	2,62
	100	Višina jajca (cm)	5,21	0,20	4,70	5,65	3,94
	100	Indeks oblike	78,81	2,98	70,27	85,59	3,78
	100	Barva lupine (%)	47,93	7,90	31,30	70,50	16,49
	100	Masa jajca ob vlaganju (g)	49,36	3,67	41,30	59,30	7,44
	100	Masa jajca ob prelaganju (g)	42,97	3,45	35,30	51,40	8,03
	100	Masa piščanca (g)	32,25	2,71	25,80	40,90	8,42
	100	Izguba mase jajca do 18. dne (g)	6,39	0,95	4,20	9,70	14,88
	100	Volumen jajca (cm ³)	52,74	4,07	44,36	65,38	7,71
	100	Površina jajca (cm ²)	67,13	3,68	58,83	77,78	5,49
Px-G	96	Širina jajca (cm)	4,19	0,10	3,90	4,50	2,58
	96	Višina jajca (cm)	5,37	0,18	4,90	5,90	3,46
	96	Indeks oblike	78,14	2,86	71,55	84,84	3,67
	96	Barva lupine (%)	36,92	7,97	20,30	63,80	21,59
	96	Masa jajca ob vlaganju (g)	53,45	3,57	45,20	63,80	6,68
	96	Masa jajca ob prelaganju (g)	46,84	3,55	38,40	56,30	7,58
	96	Masa piščanca (g)	35,33	3,21	29,40	53,30	9,08
	96	Izguba mase jajca do 18. dne (g)	6,60	1,41	-2,50	11,30	21,48
	96	Volumen jajca (cm ³)	56,57	3,95	47,80	67,12	6,99
	96	Površina jajca (cm ²)	70,53	3,41	62,99	79,79	4,84

Px-Č=Prelux-Č; Px-G=Prelux-G; Povp.=srednja vrednost; SD=standardni odklon; Min.=minimalna vrednost; Maks.=maksimalna vrednost; KV=koeficient variabilnosti

Ker rejski cilj slovenske selekcije kokoši lahkega tipa ostaja selekcija na temnejšo lupino, se kokoši z neustreznimi vrednostmi za barvo lupine ne odbira za starše naslednje generacije, razen če ne izstopajo v drugih lastnostih. Do podobnih rezultatov kot v naši raziskavi je prišla Strelčeva (2008), ki je v poskus vključila 162 kokoši pasme slovenska rjava kokoš in 162 kokoši pasme slovenska grahasta kokoš. V 18. tednu starosti jih je iz talne reje preselila v individualne kletke trinadstropne baterije. Nesnost je spremljala od 20. do 72. tedna starosti. Vsake štiri tedne je pobrala naključni vzorec 30 jajc po pasmi za meritve fizikalnih lastnosti jajc.

Preglednica 4: Osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti šest dni starih valilnih jajc pri dveh križankah kokoši

Starost jajc: 6 dni							
Križanka	Št. vloženi jajc	Lastnost valilnega jajca	Povp.	SD	Min.	Maks.	KV (%)
Px-Č	94	Širina jajca (cm)	4,09	0,09	3,78	4,31	2,31
	94	Višina jajca (cm)	5,21	0,20	4,70	5,72	3,98
	94	Indeks oblike	78,60	3,19	70,62	90,00	4,06
	94	Barva lupine (%)	44,97	6,97	31,00	67,10	15,50
	94	Masa jajca ob vlaganju (g)	49,36	3,40	40,90	57,40	6,90
	94	Masa jajca ob prelaganju (g)	42,89	3,33	34,60	52,30	7,78
	94	Masa piščanca (g)	31,95	2,71	25,60	40,40	8,48
	94	Izguba mase jajca do 18. dne (g)	6,46	0,96	4,40	9,60	14,87
	94	Volumen jajca (cm ³)	52,42	3,55	43,89	60,63	6,78
	94	Površina jajca (cm ²)	66,92	3,37	59,20	75,26	5,03
Px-G	101	Širina jajca (cm)	4,19	0,13	3,84	5,15	3,29
	101	Višina jajca (cm)	5,38	0,20	4,34	5,82	3,83
	101	Indeks oblike	77,90	3,64	70,26	93,77	4,68
	101	Barva lupine (%)	36,81	7,77	19,00	65,80	21,11
	101	Masa jajca ob vlaganju (g)	53,18	3,08	42,60	60,40	5,80
	101	Masa jajca ob prelaganju (g)	46,92	3,08	35,70	55,20	6,57
	101	Masa piščanca (g)	34,52	2,32	27,70	40,50	6,74
	101	Izguba mase jajca do 18. dne (g)	6,26	1,43	-3,60	9,20	22,92
	101	Volumen jajca (cm ³)	56,68	4,90	43,01	90,00	8,64
	101	Površina jajca (cm ²)	70,67	3,90	55,51	91,92	5,52

Px-Č=Prelux-Č; Px-G=Prelux-G; Povp.=srednja vrednost; SD=standardni odklon; Min.=minimalna vrednost; Maks.=maksimalna vrednost; KV=koeficient variabilnosti

Najtemnejšo barvo lupine so imela jajca slovenskih rjavih kokoši (matere Prelux-G) in najsvetlejšo barvo lupine jajca slovenskih grahastih kokoši (matere Prelux-Č) (Strelec, 2008). Valilna jajca križank Prelux-Č so bila pri vseh starostih lažja od valilnih jajc križank Prelux-G (preglednice 1-5). Tudi za maso jajc je podobno kot za barvo lupine značilna dokaj visoka heritabiliteta, nekje od 0,48 do 0,59 (Francesch in sod., 1997).

Preglednica 5: Osnovni statistični parametri za zunanje lastnosti osem dni starih valilnih jajc pri dveh križankah kokoši

Starost jajc: 8 dni							
Križanka	Št. vloženih jajc	Lastnost valilnega jajca	Povp.	SD	Min.	Maks.	KV (%)
Px-Č	100	Širina jajca (cm)	4,08	0,10	3,85	4,32	2,46
	100	Višina jajca (cm)	5,19	0,21	4,19	5,69	4,18
	100	Indeks oblike	78,70	3,55	71,58	97,61	4,51
	100	Barva lupine (%)	45,53	7,26	28,70	64,90	15,95
	100	Masa jajca ob vlaganju (g)	48,71	3,32	41,00	58,20	6,83
	100	Masa jajca ob prelaganju (g)	42,36	3,25	34,60	51,70	7,68
	100	Masa piščanca (g)	31,55	2,50	25,30	38,00	7,93
	100	Izguba mase jajca do 18. dne (g)	6,35	0,95	4,00	9,80	15,05
	100	Volumen jajca (cm ³)	51,86	3,73	41,93	61,75	7,20
	100	Površina jajca (cm ²)	66,42	3,53	53,89	75,78	5,31
Px-G	108	Širina jajca (cm)	4,16	0,09	3,97	4,46	2,19
	108	Višina jajca (cm)	5,40	0,18	5,00	5,86	3,37
	108	Indeks oblike	77,09	2,91	69,28	86,62	3,78
	108	Barva lupine (%)	35,11	7,82	8,70	57,70	22,27
	108	Masa jajca ob vlaganju (g)	52,97	2,82	46,80	60,60	5,32
	108	Masa jajca ob prelaganju (g)	46,58	2,98	39,00	57,00	6,40
	108	Masa piščanca (g)	34,41	2,31	28,80	41,80	6,72
	108	Izguba mase jajca do 18. dne (g)	6,39	1,39	-3,60	8,90	21,76
	108	Volumen jajca (cm ³)	56,20	3,29	49,31	68,17	5,85
	108	Površina jajca (cm ²)	70,53	2,95	63,61	80,17	4,19

Px-Č=Prelux-Č; Px-G=Prelux-G; Povp.=srednja vrednost; SD=standardni odklon; Min.=minimalna vrednost; Maks.=maksimalna vrednost; KV=koeficient variabilnosti

Sicer pa poleg genetskega dejavnika na maso znesenih jajc vplivajo še številni drugi dejavniki kot npr. starost kokoši, položaj jajca znotraj serije znesenih jajc, čas znesenja jajca (ovipozicije), telesna masa kokoši, sestava krmnih mešanic, osvetljevalni program (King'ori, 2012). Naši rezultati se ujemajo z rezultati Strelčeve (2008), kjer so slovenske rjave kokoši nesle težja jajca od slovenskih grahastih kokoši. V povprečju so bila jajca pasme Prelux-G za 0,10 mm širša in za 0,17 mm višja od jajc pasme Prelux-Č. Ker ta dva parametra vstopata v formulo za izračun volumna oziroma površine jajca je razumljivo, da so imela jajca Prelux-G pri vseh starostih večji volumen in površino kot jajca Prelux-Č (preglednice 1-5). Ker je bila razlika med križankama v višini jajca večja kot v širini, so bila jajca Prelux-Č bolj okrogla (povprečen indeks oblike 78,4) in jajca Prelux-G bolj podolgovata (povprečen indeks oblike 77,8). Oblika kokošjega jajca lahko v odvisnosti od velikosti, starosti in zdravja kokoši precej variira. Nanjo vplivajo jajcevod kokoši, razporeditev notranjih organov in oblika medeničnih kosti (King'ori, 2012). V splošnem na obliko jajca vplivajo pritiski sten jajcevoda med njegovim nastajanjem. Indeks oblike jajca, ki predstavlja razmerje med širino in višino jajca, se spreminja v odvisnosti od genotipa živali, velikosti jajca, položaja jajca v nesni seriji in v odvisnosti od časa znesenja jajca (King'ori, 2012). Jajca Prelux-G vseh starosti z izjemo 6 dni starih so v času prvih 18 dni valjenja izgubila več mase kot jajca Prelux-Č (preglednice 1-5). Izguba mase nastopi, ko s

staranjem jajca beljak vodeni, sproščena voda pa nato prehaja skozi pore v lupini v okolico (Zakaria in sod., 2009). Večja jajca imajo večji delež beljaka in torej večjo vsebnost vode kot manjša jajca. Na izgubo vode močno vplivata tudi poroznost lupine in stanje kutikule, ki to lupino prekriva. Kutikula do določene mere zapira pore v lupini in torej otežuje izgubo vode (Navarro in sod., 2013). Iz preglednice 6 je razvidno, da je bila pri križanki Prelux-Č valilnost najslabša pri starosti jajc 6 dni (63,5 %) in najboljša pri vlaganju svežih jajc (68,5 %). Pri križanki Prelux-G se je največ piščancev glede na število vloženih jajc izvalilo, ko smo vlagali 8 dni stara jajca (72,0 %) in najmanj, ko smo vlagali 5 dni stara (64,0 %). Zaradi visokega parcialnega pritiska ogljikovega dioksida v jajcevodu kokoši se v beljaku jajca po znesenju nahaja precej tega plina. Takoj po znesenju začne CO₂ izhajati iz jajca in pH vrednost beljaka postopno narašča. Walsh (1993, cit. po Brake in sod., 1997) poroča, da je optimalna pH vrednost beljaka za rast zarodka med 8,2 in 8,8. Zgodnje celične aktivnosti v zarodku nadzirajo encimi, katerih delovanje je odvisno od pH-ja. Po drugi strani bazičen pH varuje zarodek pred morebitno bakterijsko kontaminacijo (Incubation guide, 2016).

Preglednica 6: Število piščancev izvaljenih iz različno starih valilnih jajc križank Prelux-Č in Prelux-G

Starost valilnih jajc (dni)	Križanka	Število vloženih jajc v valilnik	Število izvaljenih petelinčkov	Število izvaljenih jarčk	Skupaj izvaljenih piščancev	Odstotek valilnosti*	Razmerje ♂ : ♀
1	Px-Č	149	43	59	102	68,5	1 : 1,37
	Px-G	150	45	55	100	66,7	1 : 1,22
3	Px-Č	150	60	39	99	66,0	1 : 0,65
	Px-G	150	50	53	103	68,7	1 : 1,06
5	Px-Č	150	46	54	100	66,7	1 : 1,17
	Px-G	150	53	43	96	64,0	1 : 0,81
6	Px-Č	148	55	39	94	63,5	1 : 0,71
	Px-G	150	50	51	101	67,3	1 : 1,02
8	Px-Č	150	48	52	100	66,7	1 : 1,08
	Px-G	150	59	49	108	72,0	1 : 0,83
SKUPAJ:		1497	509	494	1003	67,0	1 : 0,97

Px-Č=Prelux-Č; Px-G=Prelux-G

* Število izvaljenih piščancev glede na število vloženih jajc

Jajce mora torej izgubiti nekaj CO₂, da se izboljša valilnost, vendar ne preveč, saj ima lahko previsoka pH vrednost negativen vpliv na začetek embrionalne rasti in na vitalnost zarodka (Onagbesan in sod., 2007). Do največjega porasta v pH vrednosti pride v prvih 3-4 dneh po znesenju jajca. Prav zato se iz popolnoma svežih jajc piščanci ne valijo najbolje (prenizek pH), temveč morajo preteči 3-4 dnevi, da se valilnost izboljša. Valilnost začne upadati po 8 dneh skladiščenja (Tona in sod., 2003). V našem poskusu jajca ob vlaganju v valilnik niso bila starejša od 8 dni, zato ni velikih razlik v valilnosti med posameznimi starostnimi skupinami jajc. Od desetih možnih kombinacij (5 starosti valilnih jajc x 2

križanki) se je v šestih primerih izvalilo več jarčk kot petelinčkov, v štirih primerih pa obratno, več petelinčkov kot jarčk (preglednica 6).

4.2 MULTIVARIATNA LOGISTIČNA REGRESIJA

V poskus smo vključili kokoši, ki so pripadale dvema hibridoma (križancema). Znotraj vsakega hibrida smo razpolagali s petimi starostnimi skupinami jajc.

Preglednica 7: Multivariatna logistična regresija: vpliv zunanjih lastnosti jajc, križanke in starosti jajc ter njune interakcije na spol piščanca

Neodvisna spremenljivka	SP	OP (β)	SE (β)	Wald χ^2	P vred.	RO exp(β)	95 % IZ za RO	
Konstanta	1	-1,952	64,404	0,0009	0,975			
Masa jajc ob vlaganju (g)	1	-0,051	0,070	0,532	0,465	0,950	0,828	1,090
Širina jajca (cm)	1	-4,823	16,588	0,084	0,771	0,008	<0,001	>999,999
Višina jajca (cm)	1	6,284	15,841	0,157	0,691	536,373	<0,001	>999,999
Indeks oblike	1	0,132	0,256	0,268	0,604	1,142	0,691	1,887
Barva lupine (%)	1	-0,009	0,008	1,181	0,277	0,991	0,974	1,007
Masa jajca ob prelaganju (g)	1	0,040	0,042	0,887	0,346	1,041	0,958	1,131
Volumen jajca (cm ³)	1	0,499	0,700	0,508	0,475	1,648	0,418	6,504
Površina jajca (cm ²)	1	-0,693	1,759	0,155	0,693	0,500	0,016	15,717
Starost jajc	1 dan	-0,322	0,282	1,308	0,252			
Starost jajc	3 dni	-0,175	0,287	0,372	0,541			
Starost jajc	5 dni	0,100	0,285	0,122	0,725			
Starost jajc	6 dni	-0,176	0,279	0,396	0,528			
Križanka	Px-Č	-0,170	0,307	0,306	0,579			
Starost jajc*križanka	1 dan Px-Č	0,076	0,402	0,036	0,848			
Starost jajc*križanka	3 dni Px-Č	0,682	0,407	2,803	0,094			
Starost jajc*križanka	5 dni Px-Č	-0,134	0,402	0,112	0,737			
Starost jajc*križanka	6 dni Px-Č	0,615	0,404	2,317	0,127			

Razmerje verjetij (obeto) – Likelihood Ratio: $\chi^2 = 21,740$ P = 0,194

Score test: $\chi^2 = 21,513$ P = 0,204

Wald test: $\chi^2 = 21,080$ P = 0,222

Px-Č=Prelux – Č; Px-G=Prelux – G; OP(β)=Ocena parametra (β); SE(β)=Standardna napaka (β); RO exp(β)=razmerje obeto exp(β); 95 % IZ za RO=95 % interval zaupanja za razmerje obeto

Možno je, da bi bila povezava med zunanjimi lastnostmi valilnih jajc in spolom izvaljenih piščancev odvisna od križanke in od starosti vloženih jajc, zato smo ti dve spremenljivki ter tudi njuno interakcijo, čeprav nista bili osrednji za naše proučevanje, vključili v model in tako prišli do multivariatnega logističnega modela. Za referenčne skupine smo vzeli jarčke, osem dni stara jajca in križanko Prelux-G. Rezultati multivariatne logistične regresije so prikazani v preglednici 7. Po metodi maksimalnega verjetja smo dobili ocene parametrov modela, torej vrednosti » β «. Parameter $\exp(\beta)$ predstavlja razmerje obetov za i-to spremenljivko ob upoštevanju ostalih neodvisnih spremenljivk, ki so v modelu. Drugače povedano: če bi bile vrednosti vseh ostalih spremenljivk v modelu iste, bi bilo razmerje obetov za i-to spremenljivko $\exp(\beta)$. Razmerja obetov so množilna meritev tveganja in lahko zavzamejo vrednosti od 0 do neskončnosti. Razmerje obetov »1« nam pove, da proučevani dejavnik ne spreminja tveganja. Razmerja obetov večja od 1 pomenijo močno povezavo, razmerja obetov manjša od 1 pa manjšo povezavo. V preglednici 7 prikazana $\exp(\beta)$ vrednost je razmerje med obeti, da bo izvaljen piščanec petelinček in obeti, da bo izvaljen piščanec jarčka. Ob predpostavki, da bi bil vpliv statistično značilen ($P < 0,05$), kar pa ni, in da bi vrednosti ostalih spremenljivk v modelu ostale konstantne, bi na primer povečanje vrednosti volumna jajca za eno enoto ($=1 \text{ cm}^3$) povečalo verjetnost, da se bo iz jajca izvalil petelinček za 1,65 krat. Prav tako bi ob predpostavki, da bi ostale spremenljivke v modelu ostale konstantne in da bi bil vpliv statistično značilen, povečanje mase jajca ob prelaganju za eno enoto ($= 1 \text{ g}$) za 1,04 krat povečalo verjetnost, da bo izvaljeni piščanec petelinček (preglednica 7). Če je parameter β negativen, se glede na negativno korelacijo vrednosti $\exp(\beta)$ razlaga kot zmanjšanje. Ker so P-vrednosti, prikazane v preglednici 7, večje od mejne statistične značilnosti ($P > 0,05$), lahko sklenemo, da so vplivi vseh v preglednici 7 prikazanih spremenljivk na spol piščancev statistično neznačilni. Test razmerja verjetij (obetov), kot tudi Scorejev in Waldov test nam nakazujejo, da se uporabljeni model kot celota ne prilega bolje kot prazni model oziroma uporabljeni model ni statistično značilen. Pri kokoših je spol določen kmalu po ovulaciji, v času prve mejotične delitve, ko segregacija spolnih kromosomov (pri pticah je samica heterogametnega spola) dodeli jajčni celici kromosom W ali Z, preostali spolni kromosom pa v polarno telo (Sturkie, 2000, cit. po Yilmaz-Dikmen in Dikmen, 2013). Kmalu po ovulaciji jajčno celico oplodi v lijaku jajcevoda prisoten spermij. To se zgodi, še preden se okrog jajčne celice in rumenjaka začnejo nalagati plasti beljaka. Pri vrstah, ki nesejo jajca vsakodnevno, folikli ovulirajo približno na vsakih 24 ur. V pričujoči raziskavi nismo ugotovili, da bi katera od proučevanih zunanjih lastnosti valilnih jajc nastopala v statistično značilni povezavi s spolom piščancev (preglednica 7).

V obliki jajc obstaja velika variabilnost med jajci, znesenimi v določeni seriji (Ligon in Ligon, 1978 cit. po Yilmaz-Dikmen in Dikmen, 2013), in pri nekaterih vrstah je bilo ugotovljeno, da oblika jajca korelira s spolom mladičev v smislu, da se iz večjih jajc izvalijo samci, iz manjših pa samice ali obratno. Vsaka od teh lastnosti, velikost ali oblika, nudi staršem možnost, da »izberejo« spol mladičem s tem, ko nekatera jajca izločijo iz

postopka valjenja. Ligon in Ligon (1990, cit. po Yilmaz-Dikmen in Dikmen, 2013) sta ta mehanizem ugotovila pri zeleni drevesni smrdokavri (*Phoeniculus purpureus*). Pomembno je vedeti, da sta velikost in oblika znesenih jajc, bodisi aktivno ali pasivno pod kontrolo matere, ter da gre lahko za mehanizem detekcije spola pri tistih vrstah, ki pred znesenjem jajca na spol ne morejo vplivati (Pike in Petrie, 2003). V naši raziskavi nismo ugotovili nobene povezave med obliko jajca in spolom piščanca ($P > 0,05$). Yilmaz-Dikmen in Dikmen (2013) sta pri nesnicah jajc z belo lupino ugotovila, da obstaja velika verjetnost, da se bo iz bolj koničastega jajca izvalil petelinček, iz bolj okroglega pa jarčka. Tudi Mulder in Wollan (1974, cit. po Yilmaz-Dikmen in Dikmen, 2013) poročata o veliki verjetnosti, da se bo iz bolj okroglega jajca izvalila jarčka iz bolj koničastega pa petelinček. Cordero in sod. (2000) so znotraj iste serije znesenih jajc medsebojno primerjali jajca iz katerih so se valili samčki vrabcev z jajci iz katerih so se valile samičke ter ugotovili, da spol zarodka pojasni 7 % variance v relativni višini jajca. Povezava med širino oziroma višino jajca na eni strani in spolom piščanca na drugi strani v naši raziskavi ni bila značilna ($P > 0,05$) (preglednica 7). Yilmaz-Dikmen in Dikmen (2013) ugotavljata, da se z naraščanjem višine valilnega jajca zmanjšuje verjetnost, da bo izvaljeni piščanec jarčka. Do podobnih ugotovitev so pri jajcih domačega vrabca prišli Cordero in sod. (2000). Čeprav med širino jajca in spolom vrabčkov niso zaznali nobene povezave, so bila jajca, iz katerih so se valili samčki, značilno daljša od jajc iz katerih so se valile samičke (Cordero in sod., 2000). Jull in Quinn (1925) nista našla nobene povezave med višino jajca in spolom piščanca, ki se je iz dotičnega jajca izvalil. Na osnovi raziskave opravljene, na jajcih sivega sokola, Burnham in sod. (2003) pišejo, da sta pri tej vrsti višina in širina jajca zelo nezanesljiva kazalnika spola izvaljenih mladičev.

Povezava med maso valilnih jajc ob njihovem vlaganju v valilnik in spolom piščancev ni bila statistično značilna ($P > 0,05$) (preglednica 7). Tudi če bi bila značilna, ne bi bila informativna, saj znaša razmerje obetov 0,95. Za težja jajca lahko predpostavimo, da v absolutnem smislu vsebujejo več hranil in da se bodo iz njih izvalili večji piščanci kot iz drobnejših jajc (Meathrel in Ryder, 1987). Pod takimi pogoji sta Trivers in Willard (1973, cit. po Yilmaz-Dikmen in Dikmen, 2013) predpostavila, da se bodo iz težjih jajc valili večinoma petelinčki. Da se iz težjih jajc valijo po večini petelinčki, iz lažjih pa jarčke, je ugotavljal že Lienhart (1919, cit. po Yilmaz-Dikmen in Dikmen, 2013). Jull in Quinn (1925) poročata, da masa jajca ne nastopa v nikakršni povezavi z razmerjem med spoloma. O vplivu mase jajca na spol mladiča poročajo pri belem kronanem vrabcu (*Zonotrichia leucophrys oriantha*) (Mead in sod., 1987), ameriški postovki (*Falco sparverius*) (Anderson in sod., 1997) in domačem vrabcu (*Passer domesticus*) (Cordero in sod., 2000). Anderson in sod. (1997) predpostavljajo, da lahko samice ameriške postovke na ta način nadzirajo ne samo velikost jajc, temveč tudi spol njihovih potomcev. V nasprotju z navedenimi raziskavami so Magrath in sod. (2003) ugotovili, da se pri avstralski ptici *Megalurus cruralis* neodvisno od položaja jajca znotraj nesne serije iz težjih jajc valijo samičke in iz lažjih samčki. Do podobnih rezultatov so pri enobarvnem škorcu (*Sturnus*

unicolor) prišli Cordero in sod. (2001). Tudi pri tej vrsti so se iz težjih jajc valile samičke, iz lažjih pa samčki. Da med maso jajca in spolom mladiča ne obstaja nikakršna povezava ne ugotavljamo samo v naši raziskavi (preglednica 7). O istem poročajo tudi nekateri drugi raziskovalci in sicer Yilmaz-Dikmen in Dikmen (2013) pri kokoših nesnicah, Rutkowska in Cichon (2005) pri zebrastem ščinkavcu, Sagar in sod. (2005) pri Bullerjevem albatrosu (*Thalassarche bulleri*), Meathrel in Ryder (1987) pri progastokljunem galebu (*Larus delawarensis*) ter Sagar in sod. (2005) in Burnham in sod. (2003) pri sivem sokolu. Volumen jajca smo izračunali po formuli Narushina (2005), ki temelji na poznavanju širine in višine jajca. Niti volumen niti površina jajca ne kažeta statistično značilnih povezav s spolom piščancev (preglednica 7). Mead in sod. (1987) so pet let (sezona) spremljali valjenje mladičev gorskega belo-kronanega vrabca (*Zonotrichia leucophrys oriantha*) in ugotovili, da so se samčki valili iz jajc večjega volumna, medtem ko je bil volumen jajc, iz katerih so se valile samičke, manjši. Do podobnih rezultatov sta prišla Yilmaz-Dikmen in Dikmen (2013) pri kokoših nesnicah – verjetnost, da se bo iz jajca izvalila jarčka, se je zmanjševala z naraščanjem volumna jajca. Sagar in sod. (2005) izpostavljajo, da so se v njihovi študiji samčki Bullerjevega albatrosa (*Thalassarche bulleri*) valili iz jajc, katerih volumen je bil za $1,4 \pm 2,5 \text{ cm}^3$ večji od volumna jajc iz katerih so se valile samičke, pri čemer navedena razlika ni bila statistično značilna. Tudi pri severnih pribah (*Vanellus vanellus*) Lisev in sod. (2005, cit. po Yilmaz-Dikmen in Dikmen, 2013) niso odkrili nikakršnih statistično značilnih povezav med velikostjo oziroma volumnom valilnih jajc in spolom mladičev.

4.3 KORELACIJA IN REGRESIJA

V raziskavi nas je zanimalo, kakšna je povezava med maso jajc pred vlaganjem v valilnike in maso izvaljenih piščancev Prelux-G in Prelux-Č. Ker smo predpostavili linearno odvisnost obeh vpletenih spremenljivk, smo velikost njune linearne povezanosti izrazili s Pearsonovim koeficientom korelacije. Vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije se lahko nahaja med vrednostima -1 (popolna negativna povezanost spremenljivk) in 1 (popolna pozitivna povezanost spremenljivk). Na maso piščanca ob izvalitvi vpliva več dejavnikov, zato nismo računali na popolno povezanost med spremenljivkama. Rezultati, prikazani v preglednici 8, kažejo na visoko/močno povezanost med maso jajca na začetku valjenja in maso izvaljenega piščanca, pri čemer je bila ta povezava pri križankah Prelux-Č močnejša (0,89) kot pri križankah Prelux-G (0,80). V obeh primerih je bil koeficient korelacije visoko statistično značilen ($P < 0,05$) (preglednica 8).

Preglednica 8: Korelacija med maso jajc ob vlaganju v valilnik in maso izvaljenih piščancev (Pearsonov koeficient korelacije)

	Prelux – Č (n = 496 jajc)	Prelux – G (n = 508 jajc)
	Masa piščanca	Masa piščanca
Masa jajc ob vlaganju	0,89 P = 0,0001	0,80 P = 0,0001

Enačbo, ki najbolje opisuje linearno odvisnost obeh spremenljivk, mase valilnih jajc ob vlaganju v valilnik in mase piščancev, ki so se izvalili iz teh jajc je moč izračunati z linearno regresijo, ki je najbolj natančna ob visokih vrednostih Pearsonovega koeficienta. Formuli, s katerima lahko napovemo maso izvaljenih piščancev Prelux-Č in Prelux-G ob poznavanju mase valilnih jajc na začetku valjenja, sta prikazani v preglednici 9.

Preglednica 9: Enačbi za napoved mase izvaljenega piščanca na osnovi mase valilnega jajca pri križankah Prelux-Č in Prelux-G

Prelux – Č (n = 496 jajc)	Prelux – G (n = 508 jajc)
Masa piščanca (g) = - 0,8827 + 0,6686 × masa jajca ob vlaganju (g)	Masa piščanca (g) = - 0,2270 + 0,6597 × masa jajca ob vlaganju (g)

5 SKLEPI

Na osnovi rezultatov raziskave, v kateri smo ugotavljali povezave med zunanjimi lastnostmi valilnih jajc križank Prelux-G in Prelux-Č in spolom izvaljenih piščancev, smo prišli do naslednjih sklepov:

Morfoloških meritev, opravljenih na valilnih jajcih križank Prelux-G in Prelux-Č, ni mogoče uporabiti kot kazalnike spola izvaljenih piščancev. Niti ena od devetih proučevanih lastnosti valilnih jajc se ni pojavila v statistično značilni povezavi s spolom piščancev.

Pri obeh križankah, Prelux-Č in Prelux-G, obstaja med maso valilnega jajca in maso izvaljenega piščanca močna povezava. Pri križankah Prelux-Č je masa piščancev predstavljala 65,38 %, pri križankah Prelux-G pa 65,59 % začetne mase valilnega jajca.

Da bi natančneje ovrednotili dejavnike, ki vplivajo na razmerje med spoloma pri križankah Prelux-Č in Prelux-G, bi bilo potrebno izpeljati dodatne raziskave, v katerih bi poleg morfoloških lastnosti jajc, genotipa in starosti živali upoštevali še pogoje med valjenjem, zaporedje jajca v nesni seriji in morebiti še druge dejavnike.

6 POVZETEK

Pri kokoših se samci in samičke valijo v približnem razmerju 50 : 50. Z usmeritvijo genetske selekcije bodisi v prirejo jajc bodisi v prirejo mesa pred približno šestdesetimi leti se je pojavil problem s petelinčki lahkimi (nesnimi) linij, saj le ti rastejo počasi, potrebujejo veliko krme in so slabo omiščeni, zato se jih večino usmrti ter nadalje predela v kafilerijah ali uporabi v prehrani mesojedih živali. Iz teh razlogov je valjenje le ženskih živali lahkega tipa ena od prioritet perutninarstva in veliko naporov je bilo vloženih v čim zgodnejše določanje spola. Metode seksiranja zarodkov, ki jih izvajamo v času samega valjenja so delovno zelo zahtevne in neprimerne ali nepraktične za komercialno uporabo, predvsem pa ne rešujejo problema odvečnih petelinčkov, saj se ti še vedno pojavljajo le da v tem primeru v fazi zarodka in ne v obliki izvaljene živali. Zato bi bila morebitna povezava med morfološki lastnostmi valilnih jajc in spolom izvaljenih piščancev veliko bolj praktična. V tem primeru bi namreč lahko jajca, iz katerih bi se valili petelinčki prodali kot jedilna jajca. Malo raziskovalcev je proučevalo povezavo med zunanjimi lastnostmi valilnih jajc in spolom izvaljenih piščancev, zato smo skušali v naši raziskavi opredeliti morebitno povezavo med morfološki lastnostmi valilnih jajc in spolom izvaljenih piščancev pri križankah Prelux-G in Prelux-Č.

V poskusu smo uporabili 1497 valilnih jajc iz dveh različnih matičnih jat za pridobivanje križank Prelux-G (grahasta nesnica = 750 valilnih jajc) in Prelux-Č (črna nesnica = 747 valilnih jajc), ki sta bili uhlevljeni na perutninski farmi Krumperk Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Matični jati sta bili na začetku zbiranja valilnih jajc stari 24 tednov, na koncu pa 26 tednov. Poskus je potekal od 7. 10. 2015 do 5. 11. 2015 (datum izvalitve piščancev), istočasno pa smo vložili 1, 3, 5, 6 in 8 dni stara jajca, ki so bila prej hranjena v hladilnici na temperaturi 15 °C in 75 % relativni zračni vlagi. Jajc med skladiščenjem nismo obračali. Vsakega smo pred vlaganjem stehali mu izmerili širino ter višino ter določili barvo lupine. Izračunali smo tudi indeks oblike, prostornino in površino jajc. Jajca smo ponovno stehali ob premestitvi iz predvalilnika v izvalilnik, po izvalitvi pa še piščančke. Piščančke je po spolu ločilo izkušeno valilniško osebje, in sicer križanke Prelux-G po hitrosti operjanja, križanke Prelux-Č pa po barvi puha. Ugotovili smo, da so imela jajca križancev Prelux-Č v vseh obdobjih skladiščenja svetlejšo lupino (večji odstotek odbite svetlobe s površine lupine) kot jajca križancev Prelux-G.

V povprečju so bila jajca za križanko Prelux-G za 0,10 mm širša in za 0,17 mm višja od jajc za križanko Prelux-Č, zato so imela tudi večji volumen in površino ter maso kot jajca Prelux-Č. Ker je bila razlika med križankama v višini večja kot v širini, so bila jajca Prelux-Č bolj okrogla (povprečen indeks oblike je znašal 78,4) in jajca Prelux-G bolj podolgovata (povprečen indeks oblike je bil 77,8).

Jajca Prelux-G vseh starosti z izjemo 6 dni starih so v času prvih 18 dni valjenja izgubila več mase kot jajca Prelux-Č. Med maso jajca na začetku valjenja in maso izvaljenega piščančka je obstajala močna povezanost. Pri križankah Prelux-Č je masa piščancev predstavljala 65,38 %, pri križankah Prelux-G pa 65,59 % mase valilnega jajca.

Valilnost, računana na število vloženih jajc je bila pri jajcih Prelux-Č najslabša pri 6 dni starih jajcih (63,5 %) in najboljša pri vlaganju svežih jajc (68,5 %). Pri jajcih Prelux-G je bila valilnost največja, ko smo vlagali 8 dni stara jajca (72,0 %) in najslabša, ko smo vlagali 5 dni stara jajca (64,0 %). Ker valilnost začne upadati po 8 dneh skladiščenja, v našem poizkusu ni bilo velikih razlik med posameznimi starostnimi skupinami jajc.

Možno je, da bi bila povezava med zunanjimi lastnostmi valilnih jajc in spolom izvaljenih piščancev odvisna od križanke in starosti vloženih jajc, zato smo ti spremenljivki in njuno interakcijo vključili v multivariatni logistični model. Ker so bile dobljene P-vrednosti večje od 0,05, so bili vplivi vseh spremenljivk, vključenih v model, statistično neznačilni.

Od desetih možnih kombinacij (5 starosti valilnih jajc x 2 križanki) se je v šestih primerih izvalilo več jarčk kot petelinčkov, v štirih primerih pa več petelinčkov kot jarčk. Nismo ugotovili, da bi bila katera od proučevanih lastnosti valilnih jajc (širina, višina, indeks oblike, barva lupine, masa jajca ob vlaganju in prelaganju, izguba mase jajca do 18. dne, volumen in površina jajca) značilno povezana s spolom piščančkov. Najbolj variabilni izmed opazovanih lastnosti sta bili barva jajčne lupine in izguba mase jajca med valjenjem.

Za natančnejše ovrednotenje dejavnikov, ki vplivajo na razmerje med spoloma pri križankah Prelux-Č in Prelux-G bi bilo potrebno izpeljati dodatne raziskave, v katerih bi poleg morfoloških lastnosti jajc, genotipa in starosti živali upoštevali še pogoje med valjenjem, zaporedje jajca v nesni seriji in morebiti še druge dejavnike.

7 VIRI

- Alvarez A. C. 2006. Manipulation of primary sex-ratio: an updated review. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 17, 1: 1-20
- Anderson D. J., Reeve J., Bird D. M. 1997. Sexually dimorphic eggs, nestling growth and sibling competition in American Kestrels *Falco sparverius*. *Functional Ecology*: 331-335
<http://users.wfu.edu/djanders/labweb/reprints/Anderson%20et%20al%201997%20FE.pdf> (14. apr. 2016)
- Ansari H., Takagi N., Sasaki M. 1988. Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenetical Cell Genetics*, 47: 185-188.
- Aslam M. A. 2014. Offspring sex ratio bias and sex related characteristics of eggs in chicken. Dissertation. Wageningen, Wageningen University: 192 str.
<http://edepot.wur.nl/312811> (14. apr. 2016)
- Bönner B. M., Lutz W., Redmann T., Jäger S., Reinhardt B., Wissing J., Knickmeier W., Kaleta E. F. 2004. Morphometric and allometric studies on eggshells and embryos of free-living Canada geese (*Branta canadensis* Linnaeus, 1758). *European Journal of Wildlife Research*, 50: 179-186.
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10344-004-0061-0> (15. feb. 2016)
- Booth D. T. 2006. Influence of incubation temperature on hatching phenotype in reptiles. *Physiology and Biochemistry in Zoology*, 79: 274-281.
http://aerg.canberra.edu.au/library/sex_reptile/2006_Booth_TSD%20and%20Reptiles.pdf (15. feb. 2016)
- Brake J., Walsh T. J., Benton C. E. Jr., Petitte J. N., Meijerhof R., Penalva G. 1997. Egg Handling and Storage. *Poultry Science*, 76: 144–151
- Bramwell R. K. 2003. Sexing chicks in the backyard flock. *Avian Advice*, 5: 4-5.
<http://www.thepoultrysite.com/articles/95/sexing-chicks-in-the-backyard-flock/> (21. dec. 2015)
- Burnham W., Sandfort C., Belthoff J. R. 2003. Peregrine Falcon Eggs: Egg Size, Hatchling Sex, and Clutch Sex Ratios. *Condor*, 105: 327-335.
http://scholarworks.boisestate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1177&context=bio_facpubs (14. apr. 2016)
- Cavero D., Schmutz M., Icken W., Preisinger R. 2012. Attractive Eggshell Color as a Breeding Goal. *Lohmann information*, 47, 2: 15 - 21.

http://www.lohmann-information.com/doc_l_i_47_artikel12.pdf.html (15. feb. 2016)

Chambers J. R. 1990. Genetics of growth and meat production in chickens. IN: Poultry Breeding and Genetics. Crawford R.D. (ed.). Elsevier, Amsterdam: 599-643.

Cerit H., Avanus K. 2007. Sex identification in avian species using DNA typing methods. World's Poultry Science Journal 63: 91-99.

Chicken. 2016. Ensembl release 85.

http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Info/Index (29. jul. 2016)

Chue J., Smith C. A. 2011. Sex determination and sexual differentiation in the avian model. FEBS Journal, 278: 1027-1034.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2011.08032.x/epdf>
(14. dec. 2015)

Cordero P. J., Griffith S. C., Aparicio J. M., Parkin D. T. 2000. Sexual dimorphism in house sparrow eggs. Behavioral Ecology Sociobiology, 48: 353–357.

[http://www.uclm.es/profesorado/josemiguelaparcio/Publicaciones_archivos/Cordero-et al2000\(BES48\).pdf](http://www.uclm.es/profesorado/josemiguelaparcio/Publicaciones_archivos/Cordero-et al2000(BES48).pdf) (21. dec. 2015)

Cordero P. J. J., Vina Uela J., Aparicio J. M., Veiga J. P. 2001. Seasonal variation in sex ratio and sexual egg dimorphism favouring daughters in first clutches of the spotless starling. Journal of Evolutionary Biology, 14: 829-834.

[http://www.uclm.es/profesorado/josemiguelaparcio/Publicaciones_archivos/Cordero%20et%20al%202001\(JEB14\).pdf](http://www.uclm.es/profesorado/josemiguelaparcio/Publicaciones_archivos/Cordero%20et%20al%202001(JEB14).pdf) (14. apr. 2016)

Damme K., Ristić M. 2003. Fattening performance, meat yield and economic aspects of meat and layer type hybrids. World's Poultry Science Journal, 59: 50-52.

[http://www.uclm.es/profesorado/josemiguelaparcio/Publicaciones_archivos/Cordero%20et%20al%202001\(JEB14\).pdf](http://www.uclm.es/profesorado/josemiguelaparcio/Publicaciones_archivos/Cordero%20et%20al%202001(JEB14).pdf) (02. avg. 2015)

Dominant Brown D 102. 2016. Dominant CZ.

<http://dominantcz.marbyb.net/produkt/dominant-brown-d-102/?lang=en> (14. apr. 2016)

Dominant Black D 109. 2016. Dominant CZ.

<http://dominantcz.marbyb.net/produkt/dominant-black-d-109/?lang=en> (14. apr. 2016)

Ellegren H. 2000. Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. Trends in Ecology and Evolution, 15: 188-192.

http://aerg.canberra.edu.au/library/sex_general/2000_Ellegren_EvolAvianSexChrom_TREE.pdf (02. avg. 2015)

Ellendorff F., Klein S. 2003. Current knowledge on sex determination and sex diagnosis: potential solutions. *World's Poultry Science Journal*, 59: 7.

Francesch A., Estany J., Alfonso L., Iglesias M. 1997. Genetic parameters for egg number, egg weight, and eggshell color in three catalan poultry breeds. *Poultry Science*, 76: 1627–1631.

<http://ps.oxfordjournals.org/content/76/12/1627.long> (02. avg. 2015)

Fridolfsson A. K., Ellegren H. 2000. Molecular evolution of the avian CHD1 genes on the Z and W sex chromosomes. *Genetics*, 155: 1903-1912.

<http://www.genetics.org/content/genetics/155/4/1903.full.pdf> (02. avg. 2015)

Germany aims for chicken sexing in the egg by 2016. 2015. The Poultry site. (1.apr.2015)

<http://www.thepoultrysite.com/poultrynews/34741/germany-aims-for-chicken-sexing-in-the-egg-by-2016/> (14. apr. 2016)

Gershman Y. H. 2014. A simple way to determine the sex of one-day poultry chickens (basic principles). *Quantitative biology*.

<http://vixra.org/pdf/1405.0016v1.pdf> (15. feb. 2016)

Glahn R. G., Mitsos W. J., Wideman R. F. Jr. 1987. Evaluation of sex differences in embryonic heart rates. *Poultry Science*, 66: 1398-1401.

Goth A., Booth D. T. 2005. Temperature-dependent sex ratio in a bird. *Biological Letters* 1: 31-33.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1629050/pdf/rsbl20040247.pdf>
(14. dec. 2015)

Griffiths R., Orr K. 1999. The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Molecular Ecology*, 8: 671-674.

http://aerg.canberra.edu.au/library/sex_general/1999_Griffiths_Orr_AFLP_sex_marker_isolation.pdf (02. avg. 2015)

Griffiths R., Dann S., Dijkstra C. 1996. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 263: 1249-1254.

<http://www.rug.nl/research/portal/files/3258552/1996ProcRSocLondBGriffith.pdf>!null
(21. dec. 2015)

- Griffiths R., Double M. C., Orr K., Dawson R. J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7: 1071-1075.
- Griffiths R., Tiwari B. 1996. Avian CHD genes and their use in methods for sex identification in birds. International patent publication no. WO9639505. Isis Innovation, Oxford. 12 decembra 1996.
<http://www.google.com/patents/US20030191297> (02. avg. 2015)
- Hampl A. 1992. The number of digital pad scales – a new sex character in the chick? *Acta Veterinaria Brno*, 61: 93-98.
http://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb_1992061020093.pdf (21. dec. 2015)
- Hillier L. W., Miller W., Birney E., Warren W., Hardison R., Ponting C. P., Bork P., Burt D., Groenen M. A. M., Delany M. E. 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432: 695–716.
<http://www.nature.com/nature/journal/v432/n7018/pdf/nature03154.pdf> (02. avg. 2015)
- Holcman A., Terčič D., Vadnjal R. 2005. Rejski program za kokoši lahkega in težkega tipa: dopolnjen program v skladu z mnenjem komisije za pregled rejskih programov in sveta za živinorejo z dne 25.11.2005, št. 321 – 06 – 258/2005 – 5. Rodica: Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 52 str.
- How to sex chickens. 2016. Build a chicken coop easy.
<http://buildachickencoopeasy.com/tag/how-to-sex-chicken/> (14. apr. 2016)
- Incubation guide. Hubbard: 62 str.
http://www.hubbardbreeders.com/media/incubation_guide_english__030374800_0945_07012015.pdf (15. feb. 2016)
- Itoh Y., Melamed E., Yang X., Kampf K., Wang S., Yehya N., Van Nas A., Replogle K., Band M. R. 2007. Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. *Journal of Biology*, 6: 2.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2373894/pdf/jbiol53.pdf> (15. feb. 2016)
- Jull M. A., Quinn J. P. 1925. The Relationship between the weight of eggs and the weight of chicks according to Sex. *Journal of Agricultural Research*, 31: 223 - 226.
<http://naldc.nal.usda.gov/download/IND43966962/PDF> (14. apr. 2016)

- Kaleta E. F., Redmann T. 2008. Approaches to determine the sex prior to and after incubation of chicken eggs and of day-old chicks. *World's Poultry Science Journal*, 64: 391-399.
- Kerje S. 2003. Mapping genes affecting phenotypic traits in chicken. Uppsala, Acta Universitatis Upsaliensis: 40 str.
<http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:163666/FULLTEXT01.pdf> (02. avg. 2015)
- King'ori, A. M. 2012. Poultry egg external characteristics: egg weight, shape and shell colour. *Research Journal of Poultry Sciences*, 5, 2: 14-17.
<http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/rjpscience/2012/14-17.pdf> (15. feb. 2016)
- Klein S., Baulain U., Rottika M., Marx G., Thielenbein J., Ellendorff F. 2003. Sexing the freshly laid egg – development of embryos after manipulation; analytical approach and localization of the blastoderm in the intact egg. *World's Poultry Science Journal*, 59: 39-45.
- Li W. M. , Feng Y. P., Zhao R. X., Fan Y. Z., Affara N. A., Wu J. J., Fang J., Tong Q., Wang C., Zhang S. J. 2008. Sex ratio bias in early-dead embryos of chickens collected during the first week of incubation. *Poultry Science*, 87, 11: 2231-2233.
<http://ps.oxfordjournals.org/content/87/11/2231.full.pdf+html> (13. apr. 2016)
- Magrath M. J. L., Brouwer L., Komdeur J. 2003. Egg size and laying order in relation to offspring sex in the extreme sexually size dimorphic brown songlark (*Cinclorhamphus cruralis*). *Behavioral Ecology Sociobiology*, 54: 240–248.
<http://www.rug.nl/research/portal/files/6672938/2003BehavEcolSociobiolMagrath.pdf> (15. feb. 2016)
- Malagó W., Heitor M. F., Matheucci E., Medaglia A., Henrique-Silva F. 2002. Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. *BMC biotechnology*, 2: 19.
<http://biomedcentral.com/1472-6750/2/19> (02. avg. 2015)
- Mead P. S., Morton M.L., Fish B. E. 1987. Sexual dimorphism in egg size and implications regarding facultative manipulation of sex in mountain white-crowned sparrows. *Condor*, 89: 798-803.
<https://sora.unm.edu/sites/default/files/journals/condor/v089n04/p0798-p0803.pdf> (14. apr. 2016)
- Meathrel C. E., Ryder J. P. 1987. Sex ratios of ring-billed gulls in relation to egg size, egg sequence and female body condition. *Colonial Waterbirds*, 10: 72–77.

- Narushin V. G. 2005. Egg geometry calculation using the measurements of length and breadth. *Poultry Science Journal*, 84: 482-484.
<http://ps.oxfordjournals.org/content/84/3/482.long> (15. feb. 2016)
- Navarro A. B. R, Dominguez-Gasca N., Munoz A., Ortega-Huertas M. 2013. Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. *Poultry Science*, 92: 3026–3035.
<http://ps.oxfordjournals.org/content/92/11/3026.long> (15. feb. 2016)
- Onagbesan O., Bruggeman V., De smit L., Debonne M., Witters A., Tona K., Everaert N., Decuypere E. 2007. Gas exchange during storage and incubation of avian eggs: effects on embryogenesis, hatchability, chick quality and post-hatch growth. *World's Poultry Science Journal*, 63: 557-573.
- Phelps P., Bhutada A., Bryan S., Chalker A., Ferrell B., Neuman S., Ricks C., Tran H., Butt T. 2003. Automated identification of male layer chicks prior to hatch. *World's Poultry Science Journal*, 59: 33-38.
- Phelps P. 2001. Gender identification of chicks prior to hatch. IN: Proceedings of the 50th Annual National Breeders Roundtable. St. Louis, Missouri, ZDA, 3.-4. maj 2001. Tucker, Georgia, ZDA, US Poultry & Egg Association: 3-9.
- Pike T. W., Petrie M. 2003. Potential mechanisms of avian sex manipulation. *Biological Review*, 78: 553-574.
http://aerg.canberra.edu.au/library/sex_general/2003_Pike_Petrie_avian_manipulation_of_sex.pdf (13. avg. 2015)
- Pugh C. R., Peebles E. D., Pugh N. P., Latour A. A. 1993. Ultrasonography as a tool for monitoring in ovo chicken development. 1. Technique and morphological findings. *Poultry Science*, 72: 2236-2246.
- Question about eggs..PIC. 2008. Back Yard Chickens forum. (16. apr. 2008.)
<http://www.backyardchickens.com/t/46589/question-about-eggs-pic> (21. dec. 2015)
- Rutkowska J., Cichon M. 2005. Egg size, offspring sex and hatching asynchrony in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *Journal Avian Biology*, 36: 12-17.
- Saefudin Saar W., Schmutz M., Preisinger R., Schüler L. 2005. Chromosomal aberrations and early embryonic mortality in laying hens. *Archiv für Geflügelkunde*, 69: 146-150.

http://www.european-poultry-science.com/artikel.dll/m03-25mk_MjkwNDc.PDF?UID=8199F5EC52BC11229584C446AC25A1FE8A910F90311E567BE3 (02. avg. 2015)

Sagar P. M., Unwin M. J., Stahl J. C., Warham J. 2005. Variation in the size of Buller's albatross (*Thalassarche bulleri*) eggs. New Zealand Journal of Zoology, 32: 171–180.
<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03014223.2005.9518410> (14. apr. 2016)

SAS/STAT User's Guide. Version 9.2. 2008. Cary, SAS Institute.

Sex linkage. 2015. University of Utah Genetic Science.
<http://learn.genetics.utah.edu/content/pigeons/sexlinkage/> (21. dec. 2015)

Smith C. A., Katz M., Sinclair A. H. 2003. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. Biology of Reproduction, 68: 560–570.
<http://www.biolreprod.org/content/68/2/560.long> (21. dec. 2015)

Smith C. A., Roeszler K. N., Hudson Q. J., Sinclair A. H. 2007. Avian sex determination: what, when and where? Cytogenet Genome Res, 117: 165–173.

Smith C. A., Roeszler K. N., Ohnesorg T., Cummins D. M., Farlie P. G., Doran T. J., Sinclair A. H. 2009. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. Nature, 461: 267–271.

Smith C. A., Sinclair A. H. 2004. Sex determination: insights from the chicken. Bioessays 26, 120–132.
http://aerg.canberra.edu.au/library/sex_general/2004_Smith_Sinclair_sex_determination_chicken_review.pdf (14. dec. 2015)

Smyth J. R. 1990. Genetics of plumage, skin and eye pigmentation. V: Poultry breeding and genetics, Crawford R. D. (ed.). Elsevier, Amsterdam: 109-167.

Strelec A. 2008. Prireja in kakovost jajc slovenskih tradicionalnih pasem kokoši lahkega tipa. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 51 str.
http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_strelec_alenka.pdf (13. apr. 2016)

Terčič D. 2004. Kartiranje kvantitativnih lokusov za rast pri linijah kokoši (*Gallus domesticus*), selekcioniranih na večjo oziroma manjšo telesno maso: doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 263 str.

- Terčič D. 2015. Selekcija kokoši za potrebe manjših rej v Sloveniji. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko. (27.nov.2015)
http://www.kis.si/f/docs/Dogodki_OZ/Selekcija_kokosi_za_potrebe_manjsih_rej_v_Sloveniji.pdf (13. apr. 2016)
- Tona K., Bamelis F., Ketelaere de B., Bruggeman V., Moraes V. M. B., Buyse J., Onagbesan O., Decuypere E. 2003. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. *Poultry Science*, 82: 736-741.
<http://ps.oxfordjournals.org/content/82/5/736.full.pdf> (15. feb. 2016)
- Ultrazvok. 2016. Wikipedija prosta enciklopedija. (13. mar. 2016)
<https://sl.wikipedia.org/wiki/Ultrazvok> (13. apr. 2016)
- Zakaria A. H., Plumstead P. W., Romero-Sanchez H., Leksrisompong N., Brake J. 2009. The effects of oviposition time on egg weight loss during storage and incubation, fertility, and hatchability of broiler hatching eggs. *Poultry Science*, 88: 2712–2717.
<http://ps.oxfordjournals.org/content/88/12/2712.full.pdf+html> (15. feb. 2016)
- Zhao D., McBride D., Nandi S., McQueen H. A., McGrew M. J., Hocking P. M., Lewis P. D., Sang H. M., Clinton M. 2010. Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. *Nature*, 464: 237–242.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3925877/> (21. dec. 2015)
- Yamada D., Koyama Y., Komatsubara M., Urabe M., Mori M., Hashimoto Y., Nii R., Kobayashi M., Nakamoto A., Ogihara J., Kato J., Mizuno S. 2004. Comprehensive search for chicken W chromosome-linked genes expressed in early female embryos from the female-minus-male subtracted cDNA macroarray. *Chromosome Research*, 12: 741–754.
- Yilmaz-Dikmen B., Dikmen S. 2013. A morphometric method of sexing white layer eggs. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 15, 3: 203-210.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179728536006> (21. dec. 2015)
- Yilmaz A., Tepeli C., Garip M., Çağlayan T. 2011. The effects of incubation temperature on the sex of Japanese quail chicks. *Poultry Science*, 90: 2402–2406.
<http://ps.oxfordjournals.org/content/90/10/2402.full.pdf+html> (14. apr. 2016)
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*, 18: 7213-7218.
<http://nar.oxfordjournals.org/content/18/24/7213.full.pdf> (02. avg. 2015)

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so kakorkoli pripomogli, da je diplomska naloga nastala.

Posebej gre zahvala mentorju doc. dr. Dušanu TERČIČ, za vso strokovno podporo, pomoč in nasvete; ves čas izdelave diplomske naloge mi je bil na voljo in v pomoč. Hvala tudi recezentki doc. dr. Vidi REZAR in predsedniku komisiji doc. dr. Silvestru ŽGUR, za hiter in strokoven pregled, pomoč in napotke pri izdelavi diplomske naloge. Ravno tako se zahvaljujem knjižničnemu osebju za pomoč in napotke pri izdelavi. Hvala tudi ga. Sabini Knehtel za vso pomoč tako med študijem, kot tudi pri vseh formalnostih pri diplomski nalogi.

Zahvala gre tudi vsem domačim, prijateljem in znancem za vso pomoč in podporo. Hvala sodelavcem za podporo in omogočanje prostih dni, da je naloga lahko nastala.

Iskrena hvala pa tudi partnerju Petru, za vso pomoč in podporo pri izdelavi te naloge.

Hvala.