

IL SESSAGGIO MOLECOLARE

di Massimo Natale

Reggio Emilia 2005. L'amico Walter Becchi si presenta allo stand con un trasportino, all'interno un bellissimo Cardellino favato: gola bianca, che si estende a mo' di fascetta fino alla nuca, e qualche unghia bianca. Insomma, tutte le caratteristiche fenotipiche dell'acianismo ereditario. "È nato casualmente nel mio allevamento di ancestrali. Leggendo i tuoi articoli su Alcedo legati all'acianismo ereditario, so che stai lavorando a un ceppo stabile e fertile di pezzati, così sono contento di regalartelo, magari potrai rinsanguare i tuoi soggetti".

Come sempre faccio per i pezzati, mi premuro prima di tutto di accoppiare il soggetto con un ancestrale, per verificare l'effettiva sussistenza dell'acianismo (parziale) ereditario: la nascita di parte della prole affetta dal fattore pezzature, confermerebbe (o meno) la sussistenza del fattore. Per la stessa ragione, evito sempre di accoppiare i nuovi arrivi con i pezzati del mio ceppo: in caso di nascita di soggetti con macchie bianche, non avrei la certezza del "contributo genetico" anche da parte del soggetto "esterno".

Il primo dubbio che mi viene in mente, riguarda il sesso dell'esemplare. La mascherina mi sembra abbastanza corta, il nero delle spilline infiltrato. Inoltre, con l'arrivo della primavera, non "canta" con grinta, ma esegue solo qualche blando cinguettio. A marzo, provo a metterlo in un gabbione con un maschio ancestrale major. Non osservo battibecchi né atteggiamenti minacciosi. Lascio la coppia per l'intera stagione, e nulla accade, né liti efferate né atteggiamenti di nidificazione.

Primavera 2007. Più lo guardo e più i dubbi mi assalgono. È maschio o femmina?

Stavolta, va in voliera interna con una Cardellina nata l'anno precedente.

Non canta, non la corteggia. Inoltre, la femmina non nidifica. E io so quanto sia importante, nei Cardellini la "spinta" del maschio nella nidificazione della femmina. Altra stagione con un niente di fatto. Di nuovo, mi convinco si tratti di una femmina.

Campionati italiani 2007.

Mi aggiro tra gli stand. Mi imbatto in quello

dello GENTRAS Avian, che tra le altre cose si occupa di determinazione del sesso tramite DNA. Inizio a chiacchierare con la responsabile, la dott.ssa Quattrone, sulle modalità di raccolta dei campioni, sui costi e sull'affidabilità dell'esame molecolare. Inoltre, è ancora vivo nella mia mente il ricordo del sessaggio chirurgico negli Agapornis, e credo che fare un servizio dalle pagine di Alcedo sul sessaggio molecolare sia oltre che utile, anche etico.

Ci mettiamo d'accordo per effettuare il sessaggio su due esemplari del mio allevamento e documentare il tutto, per un servizio sulla rivista. Decido per una femmina "certa", e per il soggetto "favato". Così, a gennaio 2008, eseguo la raccolta dei campioni (penne e piume) e spedisco il tutto per posta prioritaria alla Gentras. A distanza di alcuni giorni, il laboratorio mi manda per e-mail il risultato dell'indagine molecolare. La femmina "test" risulta tale, il favato è un bel maschio!

Nel 2008, dal favato con una robusta femmina major, ottengo finalmente una covata di 3 piccoli, tra i quali un soggetto parzialmente acianico.

Commenti

Il sessaggio molecolare presenta indubbi vantaggi rispetto a quello chirurgico: facilità di realizzazione (bastano alcune piume del petto), costi abbastanza contenuti, nessuna necessità di una "visita" diretta da parte di un professionista (dunque non è necessario spostare gli uccelli in un ambulatorio attrezzato o far venire in allevamento il veterinario), e soprattutto nessuna violazione corporea nei riguardi del volatile. Quindi, nessun rischio per la sua sopravvivenza e uno stress notevolmente inferiore (alcuni secondi per staccare alcune piumette dal petto a dispetto dei minuti con

*A lato,
il soggetto parzialmente acianico dal sesso
dubbio, che ha ispirato questo articolo:
maschera abbastanza ristretta, spilline
screziate. L'esame del DNA ne confermerà il
sesso maschile*





La tecnica prevede il prelievo di alcune piume pettorali, che vanno distaccate con la radice e immediatamente inserite nelle buste fornite direttamente dalla ditta di diagnostica molecolare. Quindi, spedite all'indirizzo con posta prioritaria

anestesia e incisione nel caso del sessaggio chirurgico). Fino ad oggi, il sessaggio ha riguardato principalmente specie appartenenti al gruppo degli psittacidi mancanti di dimorfismo sessuale, *Agapornis* soprattutto. Mai se ne è ipotizzato un uso per i passeriformi. Viceversa, in tal direzione (sessaggio molecolare) gli impieghi possono essere tanti e vantaggiosi: sessaggio per i Fringillidi (e altre specie) dal dimorfismo

sessuale non netto (Cardellino, Fanello nordico, Organetto, Lucherino petto nero, Negrito della Bolivia, Venturone, Crociere, Cantore d'Africa, Verzellino fronte rossa, etc.), ma anche sessaggio in caso di mutazioni abolenti i disegni (per es. acianismo totale e albinismo). Inoltre, sessaggio precoce, per es. nei novelli, con lo scopo di pianificare per tempo le coppie, e nei giovani ibridi, per iniziare per tempo colorazione e preparazione alle mostre.

Abbiamo chiesto alla dott.ssa Silvia Quattrone, rappresentante scientifica della Gentrass avian, un suo commento e contributo sulla determinazione del sesso tramite esame del DNA.

*“Il problema è noto, l'assenza del dimorfismo sessuale in varie specie di uccelli, ad esempio diffusamente nei pappagalli del genere *Agapornis* (nelle specie *roseicollis*, *personatus*, *nigrigenis*, *fischer* e *lilanae*). Quando non vi è alcun dimorfismo sessuale non esistono caratteri cosiddetti fenotipici, esteriori, che possano dare indicazioni anche solo probabili di un sesso piuttosto che dell'altro. Ovviamente questo rappresenta un limite importante ai fini selettivi e di allevamento, dove la determinazione certa del sesso evita la formazione di coppie omosessuali e quindi la perdita di tempo, ma ha un riflesso rilevante anche per il benessere psicofisico degli animali, visto che una coppia composta da due femmine può anche organizzare il nido e deporre inutilmente, con dispendio di energie, e visto che talora le coppie omosessuali possono arrivare a un affiatamento tale da simulare la copula, andare incontro a stress se successivamente separate. Se escludiamo approcci pittoreschi al sessaggio, e un poco “magici”, introdotti negli anni scorsi e basati per esempio sull'analisi comportamentale continuata (analisi inevitabilmente molto soggettiva) o su altre caratteristiche ancora più improbabili, i metodi utilizzabili al momento sono essenzialmente due: il sessaggio endoscopico, o chirurgico, e il sessaggio molecolare, o “a DNA”. Il primo metodo è di fatto un vero e proprio intervento chirurgico che viene effettuato in anestesia gassosa e che comporta incisione della cavità addominale dell'animale, introduzione dell'endoscopio e osservazione degli organi riproduttivi e di altri organi. C'è in questa pratica un rischio reale di decesso, che viene minimizzato, ma mai annullato, se il veterinario che la esegue è sufficientemente esperto, e che viene notevolmente aumentato se il soggetto è ammalato o se, ad esempio nel caso di *Agapornis*, ha età inferiore a 5-6 mesi. Senza considerare, ovviamente, l'assurdità dell'eseguire un intervento chirurgico potenzialmente mortale su un animale sano, soltanto a scopo conoscitivo e non curativo. Finché il sessaggio endoscopico era la sola opzione “scientifica” disponibile*

per le specie non dimorfiche si poteva ritenere ancora sensata questa pratica, ma da quando il sessaggio molecolare ha raggiunto un grado elevatissimo di precisione e affidabilità l'approccio endoscopico dovrebbe essere archiviato - come avviene sovente, grazie alla ricerca, sia nella medicina umana che in quella veterinaria - nel novero delle procedure desuete ed anacronistiche. Ma vediamo più in dettaglio in cosa consiste l'analisi del DNA per la determinazione del sesso. A cominciare dagli anni '90 è divenuto possibile in biologia un procedimento rivoluzionario, la cosiddetta amplificazione del DNA. Questa tecnica, basata su un processo iterativo detto reazione a catena della polimerasi, permette per l'appunto di realizzare una amplificazione di specifiche sequenze di DNA, fino a un milione di volte, a partire anche da una singola copia. Ciò significa che questo segmento di DNA selezionato può essere, con un rapido procedimento di separazione, misurato nella sua lunghezza. L'applicazione corretta di questo procedimento consente una determinazione del sesso affidabile al 100%, perché sfrutta il fatto che le coppie di cromosomi sessuali (cioè i segmenti di DNA nei quali sta scritta l'informazione per determinare il sesso durante lo sviluppo) degli uccelli sono differenti nelle due specie: il maschio ha due cromosomi identici, mentre la femmina li ha diversi (è il contrario che nella nostra specie, curiosamente). L'applicazione della reazione a catena della polimerasi su un campione di DNA estraibile da una penna o anche da una piuma permette di ottenere due segmenti di DNA amplificati di lunghezza diversa (provenienti quindi da una femmina) o della stessa lunghezza (provenienti da un maschio). L'unico accorgimento importante è realizzare il prelievo alla radice, e affidarsi a un laboratorio che garantisca una conoscenza approfondita del metodo molecolare di analisi. L'informazione infatti che circola per la rete secondo la quale il sessaggio molecolare è leggermente più inaffidabile di quello endoscopico è alimentata

WHIRL


WHIRL

 GENTRAS

Volatile ID: XXXXXXXXXXXXX

Proprietario: LA NATALE

Data: 5/02/2008
"GAA BIANCA"

 GENTRAS

Gentras S.n.c.
Via Gozzi, 43
59100 Prato (PO)





Soltanto i laboratori attrezzati garantiscono risultati certi e affidabili. Nelle immagini a corredo, gentilmente messe a disposizione dalla Gentrax, i complessi macchinari utilizzati per il sessaggio molecolare



IL SESSAGGIO CHIRURGICO E ALCEDO

Settembre 2003. Alcedo è una Rivista in pieno lancio, in Italia e nel mondo. E noi vogliamo documentare fotograficamente tutto ma proprio tutto ciò che concerne questa meravigliosa passione per il mondo alato. Un collaboratore ci informa che a breve, nel suo allevamento, avrebbe ricevuto la visita di un veterinario per il sessaggio endoscopico.

Siamo contenti dell'opportunità e nell'occasione scattiamo una miriade di foto. Ma torniamo dall'esperienza alquanto turbati.

Sono passati ben 6 anni e come avete visto, non abbiamo mai pubblicato il servizio sul sessaggio endoscopico. Lo abbiamo giudicato troppo crudo e violento, innanzitutto per i nostri lettori, e poi per noi stessi, che per primi godiamo di questa passione e che facciamo da tramite tra il mondo ornitologico e i nostri abbonati. E che dunque, abbiamo una certa responsabilità di tutto quanto narrato e mostrato in foto.

Appena oggi, proponendo un metodo alternativo e indolore, riusciamo a mostrarvi pochissime immagini e in formato alquanto ridotto rispetto alle nostre abitudini grafiche.

Difficilmente dimenticheremo il momento dell'incisione, quello della sedazione e, soprattutto, quello del risveglio, tra contorsioni e battiti incontrollati delle ali.

Conosciamo bene il rischio della demagogia, nonché del buonismo, a scapito di una tecnica medica (il sessaggio endoscopico) che tanto ha dato alla moderna veterinaria.

Tuttavia, con la disponibilità di nuove tecnologie e con il dilagare delle leggi sul sacrosanto benessere animale, troviamo innegabile i vantaggi della tecnica molecolare: nessun rischio per la vita dell'animale, e stress del prelievo (delle piumette pettorali) ridotto al minimo. E come detto, possibilità di effettuare il sessaggio in maniera autonoma, dunque svincolati da altre figure professionali, a parte ovviamente l'Istituto referente di diagnostica molecolare, col quale si comunica per posta ed e-mail. Anche questa tecnica, tuttavia, presenta degli svantaggi: tempi maggiori di attesa (alcuni giorni), rischio di contaminazione del campione, che rende nullo o falso l'esito dell'esame, e soprattutto una certa diffusa inaffidabilità di taluni Istituti, che hanno spesso e ripetutamente fornito risultati opposti. In tal senso, bisognerebbe sviluppare una mappa, tra gli allevatori, per capire quale Istituto o Centro è realmente e totalmente affidabile in tale direzione. Le certificazioni fornite agli allevatori, quando fallaci, potrebbero in tal senso diventare un'importante arma legale, che potrebbe fare da monito e stimolo nell'utilizzo dei macchinari e delle sostanze più moderni e attendibili.

Il sessaggio endoscopico, dal canto suo, se eseguito da mani esperte, se le sonde presentano diametri adeguati, se l'anestetico utilizzato è quello corretto (isofluorano) presenta indubbi vantaggi e continua a rimanere tecnica efficace, ma non più d'elezione nella determinazione del sesso: sessaggio sicuro al 100% e immediato; verifica dello stato fisiologico (soggetto giovane, vecchio, in piena fase estrale o meno, soggetto con malformazioni congenite o acquisite) e patologico delle gonadi maschili e femminili; prevenzione delle frodi contro commercianti che vendono un esemplare con problemi riproduttivi od a fine carriera estrale (vecchio) per un esemplare giovane. Prevenzione o stato patologico di quadri morbosi dell'apparato riproduttore; stato degli organi emuntori, stato della milza, stato sacchi aerei (addominali e toracici) e respiratorio inferiore; durata sessaggio completo: 5-10 minuti per soggetto; risveglio (con isofluorano) pressoché istantaneo dopo la sospensione dell'anestetico; recupero del paziente dopo risveglio nel tempo massimo di 15 min. circa.

In tal senso, la moderna e microinvasiva endoscopia, rappresenta "il vero passo avanti" nel difficile mondo della patologia aviaria in quanto, grazie al grande vantaggio per la presenza dei sacchi aerei negli uccelli, si riescono a diagnosticare e a studiare quadri morbosi tanto velocemente che una volta sarebbe stato impensabile diagnosticare per tempo e quindi curare tempestivamente (vedi aspergillosi respiratoria, biopsie epatiche ecc.). Tuttavia, tale metodica, per la violazione dell'integrità corporea, per il rischio anestesilogico e per lo stress che arreca nei volatili, dovrebbe rimanere pratica alternativa, ed essere riservata ai volatili di taglia medio grande, laddove possa sussistere qualche dubbio clinico sull'età e sull'effettivo stato di salute del soggetto.

In tutti gli altri casi, è preferibile affidarsi al semplice esame del DNA.



GENTRAS
LIFE TRACING TECHNOLOGIES

CERTIFICATO DI SESSAGGIO TRAMITE ANALISI DEL DNA



Proprietario: M. Natale
Specie: Cardellino
Volatile ID: FOI 05 MW98 n° 62

Sesso: MASCHIO

Si certifica che un campione del suddetto volatile è stato sottoposto, nel rispetto delle normative vigenti, ad analisi del DNA allo scopo di determinarne il sesso, e che l'accuratezza del risultato è del 99,999%.

Il Responsabile Scientifico
Silvia Quattrone



GENTRAS
LIFE TRACING TECHNOLOGIES

CERTIFICATO DI SESSAGGIO TRAMITE ANALISI DEL DNA



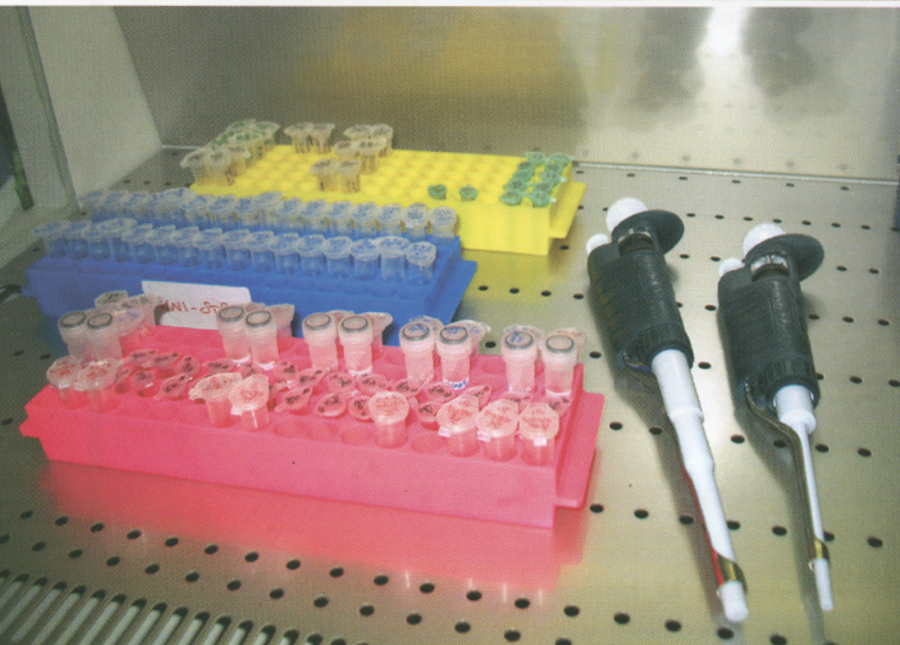
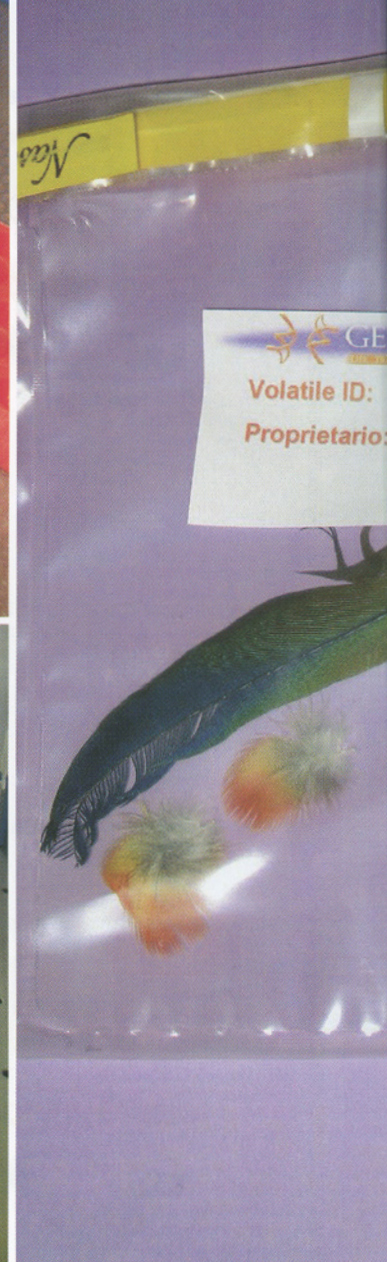
Proprietario: M. Natale
Specie: Cardellino
Volatile ID: FOI 06 54HA n° 43

Sesso: FEMMINA

Si certifica che un campione del suddetto volatile è stato sottoposto, nel rispetto delle normative vigenti, ad analisi del DNA allo scopo di determinarne il sesso, e che l'accuratezza del risultato è del 99,999%.

Il Responsabile Scientifico
Silvia Quattrone

Per e-mail, dopo alcuni giorni, arriva la certificazione del sesso, che ha validità al 99,99%. Il soggetto "campione" (già femmina riproduttrice) è stato confermato tale, mentre il soggetto realmente dubbio, è risultato maschio, sessaggio confermato dalla successiva stagione riproduttiva



dall'esistenza di laboratori improvvisati, alcuni dei quali addirittura in ambienti domestici, e di tecnici che si improvvisano in procedure di fatto abbastanza sofisticate sul piano strumentale. Un indicatore importante per discriminare è il costo dell'analisi: abbastanza contenuto ma non sotto un livello minimo, visti i prezzi dei reagenti impiegati se questi sono di qualità adeguata. In un laboratorio capace di trattare anche campioni forensi (l'expertise è infatti lo stesso, quello del cosiddetto "test

del DNA") si trova di solito la competenza adeguata a eseguire analisi di sessaggio molecolare. L'introduzione nel nostro paese del sessaggio molecolare e la scomparsa definitiva della pratica barbara di quello endoscopico è prima di tutto una battaglia di civiltà che ci auguriamo veda nel proprio esercito tutti i lettori di questa rivista. I quali, siano essi cultori, allevatori, o soltanto appassionati, sono certamente accomunati dal rispetto e dall'amore per queste creature." 🦅

La rivista **ALCEDO** ringrazia la **Gentras Avian** per i chiarimenti sulle metodiche del sessaggio molecolare nonché per la disponibilità prestata nell'invio di parte del materiale fotografico

Gentras S.n.c.
Via Gozzi n°43
59100 Prato (PO)
www.genstrasavian.com

GENTRAS AVIAN
DNA TRACING TECHNOLOGIES

CARDINALINO ISABELLA X ORGANETTO BRUNO PASTELLO

"Spett.le ALCEDO,

Allevo fringillidi da parecchio tempo ma il mio pallino sono gli ibridi. Il mio allevamento è perlopiù all'esterno e composto da una serie di voliere e volierette di dimensioni diverse. Si passa da voliere di 2 metri x 2 x 2 di altezza, a una grossa vollera di 7 metri x 3 di larghezza e 3 di altezza. Le coppie in ibridazione sono invece assortite in un capanno in legno in gabbie componibili con moduli da 60 cm dotati di separatori che, tolti o inseriti, consentono di separare o unire la coppia a piacere a seconda del comportamento che presentano durante la stagione cove. Una decina di coppie invece sono assortite in una vollera di 7 m di lunghezza suddivisa a sua volta in dieci settori di 70 cm di larghezza; profondità per tutti di 130 cm x due metri di altezza. I soggetti delle coppie che destino all'ibridazione convivono assieme tutto l'anno per favorire l'affiatamento. Solo le coppie con la femmina Canarino vengono assortite per la fine del mese di febbraio. Tutti i novelli dopo lo svezzamento vengono posti in vollera, passando poi a fine muta in gabbia singola per prepararsi ad eventuali mostre. La mia stagione cove inizia ai primi di febbraio con i Crocieri per poi entrare nel vivo al mese di maggio con le ibridazioni. Metto in cova una sessantina di coppie ibride a stagione. L'alimentazione è composta da tre tipi di miscuglio: uno per canarini, uno per cardellini-lucherini-organetti e uno per crocieri-verdoni-ciuffolotti. Ogni specie riceve poi l'integrazione necessaria in base alla specie stessa ed in relazione al periodo dell'anno. Uso i germinati da febbraio a fine muta, mentre non appena la stagione lo permette utilizzo un'enorme quantità di erbe prative (praticamente per otto mesi l'anno). Nel periodo delle cove uso le tarme bollite e surgelate e un pastoncino morbido del commercio. Allego le foto di un mio ibrido che, nelle due mostre dove ha partecipato, ha destato notevole interesse. Si tratta di Cardinalino portatore di Isabella x Organetto Pastello Bruno.

Ho utilizzato un Cardinalino ancestrale portatore di isabella di tre anni nato nel mio allevamento; lo scorso anno ho tentato di ibridarlo con una cardellina che purtroppo non ha deposto. La femmina di organetto è una pastello bruno di due anni e la scorsa stagione accoppiata ad un organetto ha generato parecchia prole. Li ho uniti il mese di novembre in gabbia e all'inizio la convivenza non è stata semplice. L'organetta non sopportava il cardinalino e lo scacciava in malo modo. Questo comportamento è proseguito per circa due mesi, dopodiché le cose sono andate meglio: i due si ignoravano! A metà di marzo li ho trasferiti dal capanno all'esterno. Fino al mese di giugno nessun segnale dall'organetta, mentre il maschio cantava a squarciagola. A metà del mese ha iniziato la costruzione del nido, costruito, come nella passata stagione, in una forcazione naturale senza usare il cestino, praticamente fissato alla parete tra un portanido e un ramo di cipresso. La posizione era talmente scomoda che non ho potuto verificare la vitalità delle uova. Fortunatamente al tredicesimo giorno di cova sono nati tre piccoli che, imboccati dalla sola organetta, sono arrivati all'indipendenza in breve tempo. Si trattava di due mutati e di un ancestrale. La femmina ha costruito il secondo nido dopo pochi giorni dall'involo della prima nidiata e anche questa volta non ha scelto uno dei tanti portanido messi a disposizione, ma ha nidificato e deposto in una mangiatoia. Quattro uova, ancora tutte feconde, purtroppo sparpagliate per terra al dodicesimo giorno. Sono riuscito fortunatamente a salvarne uno che ho passato ad una canarina. Il piccolo è nato e cresciuto con tre ibridi di lucherino x canarino. Risultato: tre mutati e un ancestrale. Con un po' più di fortuna avrei potuto ottenere un fantastico stamm. La muta è avvenuta molto velocemente in compagnia dei genitori. Come colorante ho utilizzato cantaxantina sciolta in acqua, dato che il pastoncino è stato completamente ignorato. Esposti a Saronno hanno ottenuto 92 il mutato e 91 l'ancestrale, mentre a Moguzzo i due fratelli mutati hanno ottenuto entrambi 92 punti. Ma al di là dei punteggi mi ha gratificato il commento avuto in entrambe le mostre la domenica pomeriggio da più giudici noti esperti nel campo e da altri espositori IEI. Esporrò ora i miei campioncini a Bellusco e poi, dopo quindici giorni di riposo, al campionato Lombardo a Brescia. Spero nella prossima stagione cove di ottenere qualche altro soggetto per poter poi comporre uno stamm. Distinti saluti da un vostro abbonato".