

VETERINARSKI FAKULTET
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**Određivanje spola sredozemne medvjedice (*Monachus
monachus*) lančanom reakcijom polimerazom**

Tanja Cafuk
apsolventica

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu biologiju pod vodstvom dr. sc. Tomislava Gomerčića u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske "Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu" (053-0533406-3640) voditelja prof. dr. sc. Hrvoja Gomerčića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009/2010.

Sadržaj

Uvod	1
Hipoteza	2
Materijali i metode	2
Rezultati	6
Rasprava	7
Zaključci	8
Zahvala	9
Literatura	10
Sažetak	12
Abstract	13

Uvod

Sredozemna medvjedica (morski čovik, morsko tele ili Adrijana), jedini je tuljan Sredozemlja. Nekada je bila redoviti stanovnik čitavog hrvatskog dijela jadranske obale i otoka, a u današnje doba jedna je od najrjeđih i najugroženijih životinjskih vrsta na svijetu, pa ju je u hrvatskom dijelu Jadrana moguće susresti samo ponekad (GOMERČIĆ, 1998a.). Populacija je bila samorodna vjerojatno do kraja 1960-tih godina (ANTICA, 1999.), a posljednje poznato stanište sredozemne medvjedice u Jadranu bilo je u blizini otoka Paga. Od godine 1992. se smatra da više ne živi u Jadranu (GOMERČIĆ i sur., 2006.). Razlozi ugroženosti populacije u prošlosti uglavnom su bili ribari koji su je masovno ubijali zbog uništavanja ribarskih mreža, a u novije doba urbanizacija obale. Jedini poznati uzorci tkiva sredozemnih medvjedica koje potječu iz hrvatskog dijela Jadranskog mora su dvije lubanje koje su kranimetrijski i opisane (GOMERČIĆ i HUBER, 1989.; GOMERČIĆ i sur., 2009.) te uzorak tkiva mišića, kože i kosti od lešine pronađene 2008. godine na otoku Lopudu. Svi su uzorci pohranjeni u zbirci tkiva na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, Vetreinarskog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu.

Zahvaljujući provedenim znanstvenim istraživanjima, sredozemna medvjedica je uz sve vrste kitova u Hrvatskoj zakonom zaštićena (GOMERČIĆ, 1998b.). Zakon o zaštiti prirode (NN 30/94), Pravilnik o zaštiti pojedinih vrsta sisavaca (NN 31/95).

Poznavanje populacijske strukture vrste ima velikog značaja u očuvanju populacije nekog staništa, a kako je sredozemna medvjedica u najvišem stupnju ugroženosti svaki podatak doprinosi razumijevanju biologije te vrste.

Morfološko određivanje spola ponekad je onemogućeno zbog raspadnutosti trupla ili postojanja tek malog dijela uzorka, tijela životinje, na temelju kojeg je nemoguće odrediti spol. Molekularne metode istraživanja poput lančane reakcije polimerazom (PCR) tako postaju presudne u istraživanju spola iz minimalne količine genetskog materijala.

Osnova PCR metode je određivanje postojanja ili nepostojanja određenih gena na spolnim kromosomima (SINDIČIĆ, 2005.). Određivanje spola kod sisavaca pomoću PCR metode radi se najčešće na dva načina. Prvi je umnožavanje homolognih fragmenata na X i Y kromosomu, a drugi je umnožavanje fragmenata specifičnih samo za Y kromosom, tj. za muške jedinke. Umnožavanje X i Y homolognih nizova je mnogo pouzdaniji način jer se u PCR ulazi s jednim setom početnica, a razlikovanje X i Y sljedova zahtijeva polimorfizam veličine fragmenata (NAKAHORI i sur., 1991) ili jedinstveno restrikcijsko mjesto (AASEN i MEDRANO, 1990.).

Drugi način određivanja spola kod sisavaca je umnožavanje samo *sry* fragmenta svojstvenog za Y kromosom. Tako samo uzorci dobiveni od muških životinja daju pozitivan rezultat na elektroforetskom gelu (PALSROLL i sur., 1992.; GILSON i sur., 1998.), ali negativan rezultat ne potvrđuje nužno ženku. On može biti posljedica problema sa početnicama i cjelokupnom PCR reakcijom. Iz tog se razloga uz umnožavanje *sry* fragmenta koristi paralelno i umnožavanje kontrolnih regija na DNA, poput ZFX i ZFY gena (GILSON i sur., 1998.) koji su korišteni i u ovom radu (početnice P1-5EZ, P2-3EZ). Druge dvije korištene oligonukleotidne početnice (Y53-3C, Y53-3D) dizajnirali su FAIN i LEMAY (1995.), a one se koriste za umnažanje fragmenta *sry*.

Umnožavanjem uzoraka kod ženki dobiva se jedan PCR fragment duljine 445 baznih parova, dok se umnožavanjem uzoraka kod mužjaka dobivaju dva fragmenta: jedan duljine 445 i jedan duljine 224 baznih parova.

Korištenom metodom je već dokazivan spol i kod drugih vrsta sisavaca poput jelena (GILSON i sur., 1998.), kitova (PEZER, 2003.; SULIĆ, 2004.) i medvjeda (SINDIČIĆ, 2005.).

Cilj rada mi je bio odrediti spol na temelju izolirane DNA, PCR metodom kod sredozezne medvjedice iz muzejskih lubanja i vrlo raspadnute lešine.

Hipoteza

U nekim slučajevima na temelju morfologije je nemoguće odrediti spol životinje. Pretpostavlja se da je spol sredozezne medvjedice moguće odrediti na temelju gena, tj. lančanom reakcijom polimerazom. Isto se tako pretpostavlja da je moguće izolirati DNA muzejskih uzoraka starijih od 40 godina.

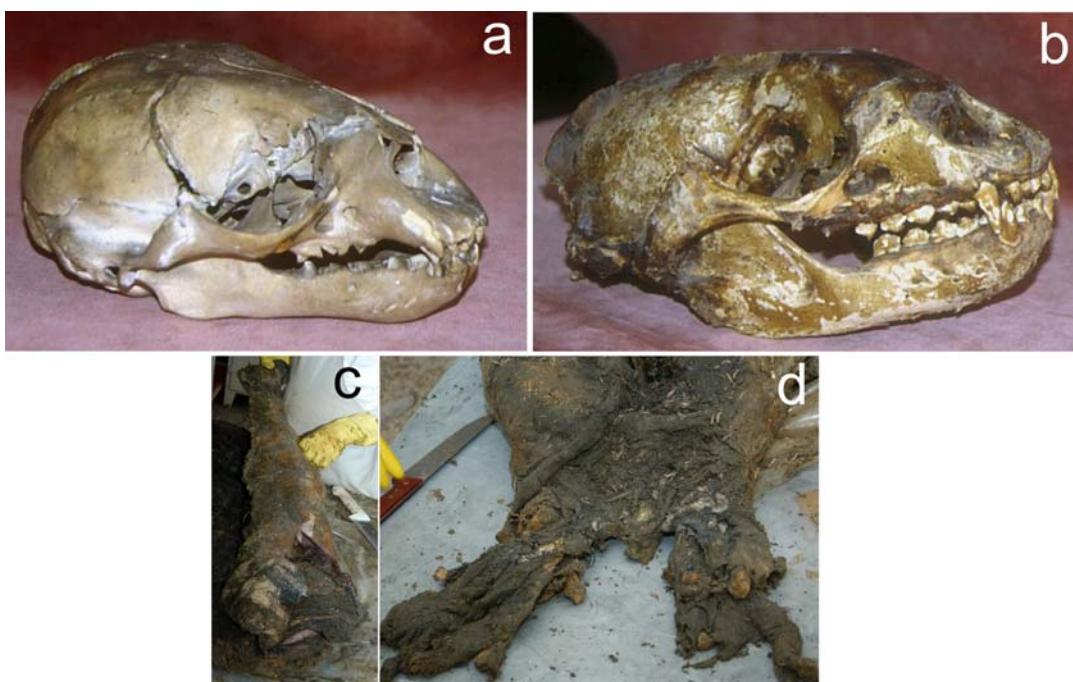
Materijali i metode

U radu su korišteni uzorci triju različitih jedinki sredozezne medvjedice stradalih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. Od dvije sredozezne medvjedice (SM1 i SM2) jedino su sačuvane lubanje, dok je od treće sredozezne medvjedice (SM3) sačuvan jedan članak prsta i uzorak vrlo trulog mišića i kože. Svi su uzorci pohranjeni u zbirci tkiva na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, Vetreinarskog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu.

Lubanja SM1 (Slika 1a., Tablica 1.) je pripadala je muškoj životinji, staroj oko 2 mjeseca i teškoj oko 80 kg, ubijenoj u vodama otoka Visa oko 1978 godine (GOMERČIĆ i HUBER, 1989). Na njoj nije bilo nikakvih ostataka mekanog tkiva.

Lubanja SM2 (Slika 1b., Tablica 1.) pronađena je u Komiži 1964. godine, a najvjerojatnije je ubijena od ribara na otoku Biševu kraj Visa. Pripadala je odrasloj životinji nepoznatog spola. Na lubanji se nalazi sasušenog mekog tkiva.

Uzorak S3 (Slika 1c. i 1d., Tablica 1.) je uzet od lešine sredozemne medvjedice pronađene 10. studenog 2008. godine nasukane u uvali Šunj na otoku Lopudu. Truplo je bilo bez vrata i glave, jako trulo, koža je potpuno macerirana, bez ikakvih utrobnih organa. U sklopu rutinskih pretraga lešina morskih sisavaca na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarskog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu, sačuvane su i pohranjena je jedan članak prsta i uzorak mišića sa kožom u 96% alkoholu i smrznut na -20 °C.



Slika 1. a) lubanja sredozemne medvjedice SM1 iz 1978. s otoka Biševa;
b) lubanja sredozemne medvjedice iz 1964. s otoka Visa; c) i d) truplo sredozemne medvjedice pronađeno 2008. godine na otoku Lopudu

U radu su rabljeni još i uzorci tkiva mišića drugih životinja poznatog spola za kontrolu PCR reakcije te usporedbu i to dvije ženke psa, jedne ženke mačke, jednog

muškog psa, vuka i čunjastog tuljana (Tablica 1.). Ovi uzorci se čuvaju u banci tkiva na Zavodu za biologiju, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 1. Popis pretraženih uzoraka

Oznaka uzorka	Vrsta jedinke	spol životinje	od kuda je izolirana DNA	Godina pronalaska	Mjesto pronalaska
S1	sredozemna medvjedica	mužjak	korijen zuba i zubna alveola	1978.	otok Biševo
S2	sredozemna medvjedica	nepoznat	krorijen zuba	1964.	otok Vis, Komiža
S3	sredozemna medvjedica	nepoznat	članak prsta	2008.	otok Lopud
pas1	pas	ženka	mišić		
pas2	pas	ženka	mišić		
mačka	mačka	ženka	mišić		
pas3	pas	mužjak	mišić		
vuk	vuk	mužjak	mišić		
tuljan	čunjasti tuljan	mužjak	mišić		

DNA od sredozemne medvjedice SM1 je bila izdvojena (Tablica 1.) iz korijena zuba, od SM2 iz korijena zuba i sasušenog tkiva iz zubne alveole, a od SM3 iz članka prsta. Izoliranje DNA je napravio Laboratorij za kliničku i sudsku genetiku, Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KBC Split.

DNA ostalih uzoraka izdvojeno je iz uzoraka mišića koristeći komercijalni kit ChargeSwitch[®] gDNA Tissue Kits, Invitrogen koji brzo i efikasno izdvaja DNA iz tkiva. Izolacija DNA rađena je prema protokolu proizvođača.

Cijeli postupak izolacije DNA i izvođenje PCR metode radila sam sa sterilnim priborom i u fizički odvojenim prostorijama, a sve u cilju smanjenja mogućnosti kontaminacije uzoraka stranom DNA ili onom iz drugih uzoraka.

Dio gena *sry* na Y kromosomu i gene ZFX i ZFY na X, odnosno Y kromosomu sam umnožila lančanom reakcijom polimerazom u dva puta promjenivši broj ciklusa, i to sa 35 i 45 ciklusa.

Za PCR sam koristeći uređaj GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), koristeći Multiplex PCR kit (Quiagen, SAD). Volumen reakcijske smjese je bio 7 µl, a sadržavao je smjesu početnica, izoliranu DNA, tekućinu iz kita "multiplex master mix" i vodu (Tablici 2.)

Tablica 2. Sastav zajedničke reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom

Reagens	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen za jednu reakciju
Smjesa početnica *	10 X (2 μ M)	0.2 μ M**	0.7
tekućina iz kita "multiplex master mix"	2 X	0.42 X	1.5
DNA kalup			1
H ₂ O, deionizirana			3.8
Ukupna količina			7

*Smjesa početnica sadrži sve četiri početnice (Y53-3C, Y53-3D, P1-5EZ, P2-3EZ).

**Odnosi se na koncentraciju svake početnice.

DNA izolate sam zatim podvrgla lančanoj reakciji polimerazom u trajanju od 35 ciklusa, a zatim na 45 ciklusa (Tablica 3.).

Tablica 3. Reakcijski uvjeti lančane reakcije polimerazom

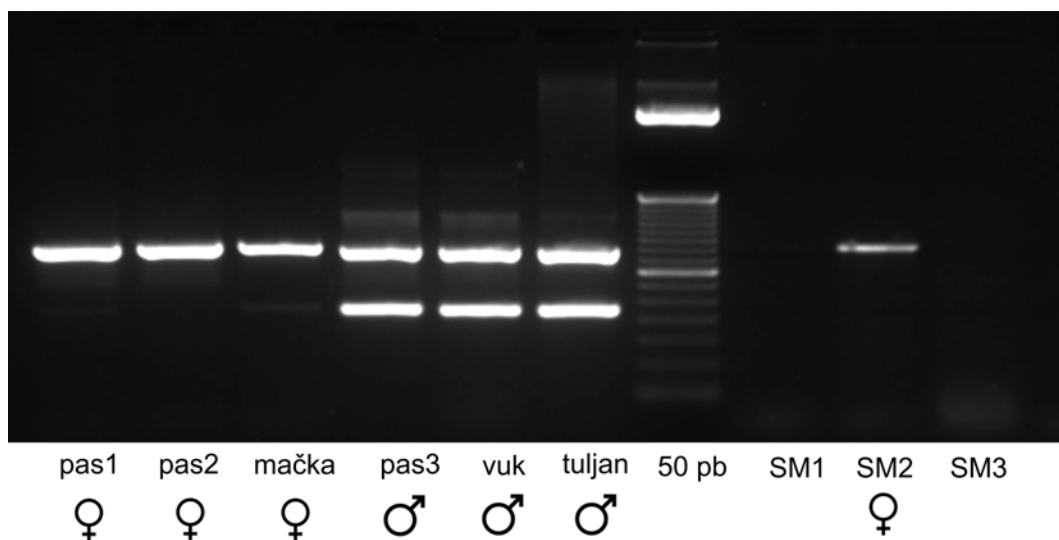
	Temperatura (°C)	Vrijeme	} 35 i 45 ciklusa
Aktivacija polimeraze	95	15 min	
Denaturacija kalupa	94	30 s	
Prianjanje početnica	48	90 s	
Produženje lanca	72	90 s	
Završno produženje	72	10 min	

Produkt dobiven PCR-om podvrgnula sam elektroforezi na 1,5% agaroznom gelu. Gel sam pripremila otapanjem 0,75 g agaroze u 50 ml 1 X TBE pufera te zagrijavanjem do vrenja nakon čega je dodano 5 μ l SYBR Safe Gel stain. Ohlađenu otopinu sam ulila u kalup i postavila češalj za jažice. Nakon polimerizacije gela na sobnoj temperaturi, na parafilmu sam izmiješala 5 μ l PCR proizvoda i 2 μ l LB (engl. Loading buffer) pufera i nannjela u jažice. Prva elektroforeza se odvijala 60 min, a druga 30 min na 90 V. Gelove sam promatrala transluminatorom i fotografirala digitalnim fotoaparatom.

Rezultati

Elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu dobiveni su PCR fragmenti različite veličine. Kod mužjaka vidljiva su dva fragmenta od 224 i 445 parova baza (bp), a kod ženki samo jedan od 445 bp.

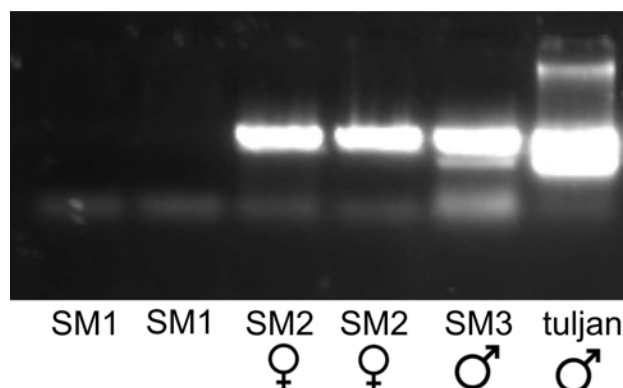
U prvoj PCR reakciji (Slika 2.) sa 35 ciklusa kod svih kontrolnih uzoraka psa, mačke, vuka i tuljana kod kojih je DNA izolirana iz svježeg mišića koji je bio čuvan u 96% alkoholu na -20 °C dobiveni su lijepo jasno vidljivi jedan ili dva PCR fragmenta, ovisno o spolu životinje. Dok se kod uzorka sredozemne medvjedice SM2 slabije ističe jedan PCR produkt od 445 bp, kod uzorka SM1 i SM3 nisam dobila PCR produkt.



Slika 2. Prikaz gela sa PCR produktima nakon elektroforeze, 35 ciklusa u PCR reakciji

U drugoj PCR reakciji zbog povećanja broja ciklusa na 45, uzorak čunjastog tuljana ima jači intenzitet fluoresciranja fragmenata. Ovdje se zapravo radi o 2 fragmenta što potvrđuje da je uzorak pripadao jedinki muškog spola. U ovoj PCR reakciji sam i pored PCR produkta od uzorka SM2 koji potvrđuje da je SM2 ženka, dobila i dva PCR produkt od uzorka SM3 i time utvrdila da je sredozemna medvjedica SM3 bila muškog spola (Slika

3.). Primjećuje se da je kraći fragment od 224 bp slabijeg intenziteta. Uzorak SM1 ni u ovoj PCR reakciji nije dao nikakav produkt.



Slika 3. Prikaz gela sa PCR produktima nakon elektroforeze, 45 ciklusa u PCR reakciji

Rasprava

Metoda određivanja spola umnažanjem dijela gena sry uz istodobno korištenje kontrolnih regija za gene ZFX/ZFY pokazala se uspješnom za određivanje spola sredozemne medvjedice. Time je ovim radom dokazano da se metoda osim za određivanje spola kod jelena (GILSON i sur., 1998.), kitova (PEZER, 2003.; SULIĆ, 2004.) i medvjeda (SINDIČIĆ, 2005.) može koristiti i za određivanje spola i kod ove vrste sisavaca. Četiri korištene oligonukleotidne početnice funkcioniraju kod različitih vrsta sisavaca (AASEN i MEDRANO, 1990.; GILSON i sur., 1998.).

Uzorak koji je pripadao sredozemnoj medvjedici SM1 nisam uspjela odrediti spol iako se iz literature zna da je bio muškog spola (GOMERČIĆ i HUBER, 1989.). Iz ove lubanje DNA smo probali izolirati iz korijena zuba, ali unatoč ponavljanju PCR reakcije spol nije bilo moguće utvrditi. Najvjerojatnije se iz te lubanje DNA nije uopće izolirala ili ne u dostatnoj količini ili je uzorak toliko star i obrađen da je u njemu DNA jako degradirana.

U ovom radu su korišteni muzejski primjerci strogo zaštićenih i jednoj od najugroženijih životinjskih vrsta na zemlji. Zbog toga su bilo kakvi podaci o ovoj vrsti vrlo dragocjeni i teško je do njih doći. Zbog toga je ova molekularna metoda određivanja značajna jer je neinvazivna, tj. mogu se koristiti bilo koji uzorci koji sadrže DNA a da se

ne ometa sama životinja, na primjer izmet i dlaka životinje koje bi se mogle naći u njihovom staništu.

Zaključci

1. Metoda je primjenjiva za određivanje spola sredozemne medvjedice (*Monachus monachus*)
2. Uspješno je određen spol 2 jedinke za koje nisu postojali podaci o spolu
3. Korištena metoda je brza, jednostavna i precizna te je pogodna za primjenu na uzorcima koštanog tkiva

Zahvala

Zahvaljujem se mr. sc. Snježani Ćurković i Magdi Sindičić, dr. vet. med. što su mi pomagale tijekom izrade praktičnog dijela rada. Zahvaljujem se Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, te Zavodu za biologiju i prof. dr. Đuri Huberu na omogućavanju korištenja njihovih molekularnih laboratorija i potrebnih kemikalija. Zahvaljujem i mentoru dr. sc. Tomislavu Gomerčiću na velikoj pomoći tijekom cjelokupne izrade ovog rada.

Literatura

- AASEN, E., J. F. MEDRANO (1990.): Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8, 1279-1281.
- ANTICA, G. (1999.): Stanje sredozemne medvjedice u hrvatskom dijelu Jadrana. Diplomski rad. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb.
- BÉRUBÉ, M., P. PALSBOÛLL (1996.): Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology* 5, 283-287.
- FAIN, S. R., J. P. LEMAY (1995.): Gender identification of humans and mammalian wildlife species from PCR amplified sex-linked genes. *Proceedings of American Academy of Forensic Sciences 1995*, str. 34.
- GILSON, A., M. SYVANEN, K. LEVINE, J. BANKS (1998.): Deer gender determination by polymerase chain reaction: validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *Fish and Game* 84, 159-169.
- GOMERČIĆ, H. (1998a.): Čovjek je njezin (ne)prijatelj. *Eurocity* (1330-0555) 1998 (1998), 2: 31-33.
- GOMERČIĆ, H. (1998b.): Zaštita morskih sisavaca – etičko i racionalno pitanje. *Etika u odnosu čovjeka i životinja*, 51-73.
- GOMERČIĆ, H., M. ĐURAS GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ, Đ. HUBER, V. GOMERČIĆ (2006.): Sredozemna medvjedica se ponovno pojavila u sjevernom Jadranu? II. znanstveni skup Prirodoslovna istraživanja riječkog područja: Knjiga sažetaka / 2006. 96-96.
- GOMERČIĆ, H., Đ. HUBER (1989.): Craniometric characteristics of the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) from the Adriatic Sea. *Periodicum biologorum* 91, 132.
- GOMERČIĆ, T., V. FARKAŠ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, Đ. HUBER, H. GOMERČIĆ (2009): Cranial morphometry of adult Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) from the Adriatic sea. In: *Proceedings of the International Scientific*

Meeting of Anatomy and Physiology Fundamentals of Medicine. Zagreb. 12-13 June 2009. (Mihelić, D., M. Šimpraga, S. Tkalcic, urednici). Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. 120-128.

NAKAHORI, Y., K. HAMANO, M. IWAYA, Y. NAKAGOME (1991.): Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *American Journal of Medical Genetics* 39, 472-473.

PALSBØLL, P. J., A. VADER, I. BAKKE, M. R. EL-GEWELY (1992.): Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Zoology* 70, 2166-2170.

PEZER, Ž. (2003): Određivanje spola u nekih vrsta kitova (Cetacea) lančanom reakcijom polimerazom. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb.

SINDIČIĆ, M. (2005.): Određivanje spola smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*) metodom lančane reakcije polimerazom. Studentski znanstveni rad. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb

SULIĆ, A. M. (2004): Određivanje spola nekih vrsta kitova (Cetacea) umnažanjem dijela gena *sry*. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb.

**Određivanje spola sredozemne medvjedice (*Monachus monachus*)
metodom lančane reakcije polimerazom**

Tanja Cafuk

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

**CAFUK, T.: Određivanje spola sredozemne medvjedice (*Monachus monachus*)
metodom lančane reakcije polimerazom.** Studentski znanstveni rad

SAŽETAK

Sredozemna medvjedica (*Monachus monachus*), jedini tuljan Sredozemlja, jedna je od najugroženijih životinjskih vrsta na Zemlji. Nekada je obitavala i u hrvatskom dijelu Jadrana. Smatra se da od 1992. godine više ne živi u Jadranu, iako povremeno neke jedinke u njega zalutaju. Poznavanje populacijske strukture vrste ima velikog značaja u očuvanju populacije nekog staništa, a kako je sredozemna medvjedica u najvišem stupnju ugroženosti svaki dobiveni podatak doprinosi razumijevanju biologije te vrste. U ovom je radu korištena lančana reakcija polimerazom (PCR), s ciljem utvrđivanja spola kod sredozemne medvjedice. Izolirana je genomska DNA iz dva muzejska primjerka lubanje sredozemne medvjedice i iz članka prsta treće jedinke. Za usporedbu se koristilo još 6 uzoraka drugih sisavaca poznatog spola, od toga je jedan uzorak čunjastog tuljana. Uz četiri oligonukleotidne početnice PCR metodom dobili smo fragmente različite duljine nastale umnažanjem dijela gena *sry* koji se nalazi na Y kromosomu i postoji samo kod mužjaka te kontrolnih regija ZFX/ZFY koje postoje kod mužjaka i ženki. Uspješno je određen spol dvije jedinke, dok je kod jednog uzorka određivanje spola bilo neuspješno.

Ključne riječi: sredozemna medvjedica, *Monachus monachus*, određivanje spola, lančana reakcija polimerazom, PCR, *sry* gen

CAFUK, T.: Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) gender determination by polymerase chain reaction

ABSTRACT

The Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) is the only seal species that inhabits Mediterranean Sea and one of the most endangered animal species of the world. Once found throughout Croatian part of the Adriatic Sea, the Mediterranean monk seal is considered extinct since 1992., although some individuals from the neighboring populations enter the Adriatic Sea and stay there temporarily. Understanding the population structure of the species has got a great significance in preserving the population of a certain habitat, so every gained information considering highly endangered Mediterranean monk seal contributes to better understanding of the species biology. In this study polymerase chain reaction (PCR) has been used for identify sex from the bone tissue samples. Genome DNA has been extracted from 2 museum monk seal skull and one from finger falange. For compare, DNA has been extracted from 6 other mammals, known sex. With the four oligonucleotide primers, used in the PCR, different length fragments (445 bp and 224 bp) have been obtained. Primers were used to simultaneously amplify a part of the *sry* gene located on the Y chromosome wich exists only in males, and control regions of ZFX/ZFY, which exists in males and females. The sex of 2 units has been successfully determined, while determination sex of one sample has been unsuccessful.

Key words: Mediterranean monk seal, *Monachus monachus*, sex determination, polymerase chain reaction, PCR, *sry* gen
